

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Kamila Zyková

KVANTITATIVNÍ ZMĚNY SLOŽENÍ SEXUÁLNÍHO
FEROMONU *ANASTREPHA FRATERCULUS*
V ZÁVISLOSTI NA STÁŘÍ

Quantitative composition changes of sex pheromone
in *Anastrepha fraterculus* depending on age

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce byla vypracována na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. v Praze a vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru IAEA – 16106.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. v Praze je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne 15. května 2013.

Abstrakt

Samečci jihoamerické mouchy *Anastrepha fraterculus* se během reprodukčního chování shlukují do rojů a vylučují sexuální feromon za účelem přilákání samic.

Cílem mé diplomové práce bylo odebrat vzorky těkavých látek vylučovaných různě starými samečkami, následně je analyzovat a z naměřených dat zjistit kvantitativní změny složení sexuálního feromonu v závislosti na stáří. Těkavé látky byly zachytávány na adsorbent, eluovány hexanem s přidáním vnitřním standardem a analyzovány na dvojdimenzionálním plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

Samečci vylučují dvacet těkavých látek, z toho čtrnáct terpenů: α -pinen, kamfen, β -pinen, myrcen, Δ^3 -karen, limonen, (Z)- β -ocimen, (E)- β -ocimen, aromadendren, *trans*- α -bergamoten, (Z)- β -farnesen, (Z,E)- α -farnesen, germakren D, (E,E)- α -farnesen; jeden aldehyd: nonanal; dva alkoholy: (3Z)-non-3-en-1-ol, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-ol a tři laktony: suspensolid, anastrefin a epianastrefin. U šesti látek z uvedeného seznamu byla prokázána v předchozí práci antenální aktivita a to u *trans*- α -bergamotenu, (Z,E)- α -farnesenu, (E,E)- α -farnesenu, (3Z)-non-3-en-1-olu, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-olu a epianastrefinu.

Klíčová slova

Anastrepha fraterculus, těkavé látky, sexuální feromon, dynamický headspace, dvojdimenzionální plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

Abstract

Males of South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* form leks and release sex pheromone to attract females during the reproductive behavior.

The aim of my diploma thesis was to collect samples of volatiles released by variously old males, subsequently to analyze and to determine the changes in the quantitative composition of the sex pheromone depending on age. The volatiles were trapped on adsorbent, eluted with hexane containing internal standard and analyzed by gas chromatography with mass detection.

Males release twenty volatiles, including fourteen terpenes: α -pinene, camphene, β -pinene, myrcene, Δ^3 -carene, limonene, (Z)- β -ocimene, (E)- β -ocimene, aromadendrene, *trans*- α -bergamotene, (Z)- β -farnesene, (Z,E)- α -farnesene, germacrene D, (E,E)- α -farnesene; one aldehyde: nonanal; two alcohols: (3Z)-non-3-en-1-ol, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-ol and three lactones: suspensolide, anastrephin and epianastrephin. From the list of named compounds there were proved antennal activity of six compounds in previous work, namely *trans*- α -bergamotene, (Z,E)- α -farnesene, (E,E)- α -farnesene, (3Z)-non-3-en-1-ol, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-ol and epianastrephin.

Keywords

Anastrepha fraterculus, volatiles, sex pheromone, dynamic headspace, two-dimensional gas chromatography, mass spectrometry

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému konzultantovi RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za zprostředkování mé diplomové práce v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. a své školitelce RNDr. Blance Kalinové, CSc. za vedení mé diplomové práce. Za objasnění metody dvojdimenzionální plynové chromatografie bych ráda poděkovala Ing. Michalu Hoskovcovi, CSc. Za užitečné rady pro mou diplomovou práci bych chtěla poděkovat Ing. Radce Břízové.

Poděkování patří také mé rodině za finanční a morální podporu po celou dobu mého studia na vysoké škole.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	7
1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 <i>Anastrepha fraterculus</i>	9
2.1.1 Obecné informace	9
2.1.2 Vývojová stadia	10
2.1.3 Reprodukční chování	11
2.2 Semiochemikálie	12
2.2.1 Allelochemikálie	12
2.2.2 Feromony	13
2.2.3 Složení samčích feromonů u rodu <i>Anastrepha</i>	14
2.3 Metody izolace feromonů.....	15
2.3.1 Extrakce žláz rozpouštědlem	16
2.3.2 Headspace technika.....	16
2.3.3 Technika nástřiku pevného vzorku	17
2.3.4 Mikroextrakce pevnou fází	17
2.4 Analytické metody identifikace feromonů.....	18
2.4.1 Elektroantenografie.....	18
2.4.2 Plynová chromatografie	19
2.4.3 Dvojdimenzionální plynová chromatografie	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Chemikálie	22
3.2 Přístroje	22
3.3 Biologický materiál	22
3.4 Pracovní postupy	23
3.4.1 Odběr vzorků	23
3.4.2 Analýza vzorků metodou GC×GC.....	24
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	25
5 ZÁVĚR.....	46
Soupis bibliografických citací	47

Seznam zkratek a symbolů

A. – *Anastrepha*

EAD – elektroantenografický detektor

FID – plamenově ionizační detektor

GC×GC – dvojdimenzionální plynová chromatografie

GC×GC-MS – dvojdimenzionální plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

KI – Kovatsův index

SPME – mikroextrakce pevnou fází

$t_{R,1}$ – retenční čas v první dimenzi[s]

$t_{R,2}$ – retenční čas v druhé dimenzi[s]

TIC – total ion current

1 ÚVOD

Jihoamerický druh ovocné mouchy *Anastrepha fraterculus* patří do čeledi Tephritidae a byl popsán Wiedemannem v roce 1830. Je nebezpečným škůdcem hospodářsky důležitých plodů, zejména pomerančů, broskví, mang a kvajáv. Tento druh čítá 32 populací rozdělených do tří skupin podle hlavních biogeografických oblastí v tropické Americe, kterými jsou střední Amerika, severozápadní oblast jižní Ameriky a regiony Chacoan a Paranaense.

A. fraterculus je polygynní druh, jehož samečci se před pářením shlukují do rojů a vylučují sexuální feromon lákající samičky. Samička si vybírá samečka a páření dlouhé několik minut až více než tři hodiny probíhá na spodní straně listu. Samičky kladou vajíčka většinou do nezralých plodů hostitelských rostlin a vylíhlé larvy se živí jejich dužinou, čímž je poškozují.

Sexuální feromony jsou těkavé látky vylučované žlázami s vnější sekrecí, kterými jsou u rodu *Anastrepha* pleurální a zvětšené slinné žlázy. Doposud bylo zjištěno, že samčí sexuální feromon druhu *A. fraterculus* obsahuje dvě formy seskviterpenu α -farnesenu, a to jeho (*E,Z*) a (*Z,E*) izomery, tři laktony anastrefin, epianastrefin a (*E,E*)- α -suspensolid a dva monoterpeny limonen a (*Z*)- β -ocimen.

Znalost kvantitativního složení feromonu *A. fraterculus* je důležitá proto, že by umožnila vytvořit paraferomonové pasti, které by v kombinaci s toxickými látkami sloužily k lákání a následnému hubení samečků, čímž by se snížil jejich počet k páření, což by mohlo vést k oslabení celkové populace.

Cílem diplomové práce bylo odebrat vzorky těkavých látek vylučovaných různě starými samečkami, následně je analyzovat metodou dvojdimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a z naměřených dat zjistit kvantitativní změny složení sexuálního feromonu v závislosti na stáří.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Anastrepha fraterculus*

2.1.1 Obecné informace

Anastrepha fraterculus je druh jihoamerické ovocné mouchy, který patří do čeledi Tephritidae (vrtulovití), popsáný v roce 1830 Wiedemannem na základě jedinců z Brazílie. Přesto, že téměř v celé jižní Americe je tento druh považován za nejdůležitější z rodu *Anastrepha*, nebyl přijat jeho obecný název, a tudíž pro něj existuje mnoho synonym, např. *Tephritis mellea* Walker, *A. peruviana* Townsend, *A. brasiliensis* Greene, *A. pseudofraterculus* Capoor¹. *A. fraterculus* je nebezpečným škůdcem mnoha ovocných stromů včetně hospodářsky důležitých plodů jako jsou pomeranče, broskve, manga a kvajávy².

V roce 1942 Alan Stone předpokládal, že se jedná o vysoce variabilní druh vyskytující se od Texasu po centrální jižní Ameriku a identifikoval jedince z broskve a kvajávy jako *A. fraterculus*. Nicméně později došel k názoru, že populace vyskytující se od Texasu po Argentinu jsou nejspíše reprezentovány více druhy. R. H. Foote se domníval, že existují nejméně čtyři biologicky odlišné populace v rámci druhu *A. fraterculus*, ale k přesnějšímu určení nebyl dostatek biologických a taxonomických dat¹. Později bylo zjištěno, že druh *A. fraterculus* zahrnuje 32 populací (Obr. 2.1), které byly rozděleny na tři skupiny podle jejich zeměpisného rozšíření určeného hlavními biogeografickými oblastmi v tropické Americe a to na střední Ameriku, severozápadní část jižní Ameriky a na regiony Chacoan a Paranaense. Středoamerická oblast je reprezentována sedmi populacemi z Mexika, jednou z Guatemaly a dvěma populacemi z Panamy. Do oblasti severozápadní jižní Ameriky patří pět populací z Venezuely, dvě z Kolumbie, jedna z Ekvádoru a dvě populace z Peru. Regiony Chacoan a Paranaense jsou reprezentovány čtyřmi populacemi z Argentiny a osmi z Brazílie³.



Obr. 2.1 Mapa s označením jednotlivých populací *A. fraterculus*³

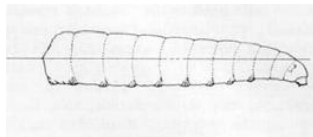
2.1.2 Vývojová stadia

Vajíčka *A. fraterculus* jsou podlouhlá, smetanově bílá o průměrné velikosti 1,4 mm (Obr. 2.2) a zužující se na koncích. Vajíčka *A. fraterculus* se od ostatních z rodu *Anastrepha* odlišují zatočeným mikropylárním koncem.



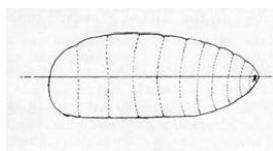
Obr. 2.2 Vajíčko¹

Z vajíček se líhnou larvy, které se kvůli růstu třikrát svlékají. Čtvrtému neaktivnímu instar stadiu předchází tvorba kukly, ke které dochází uvnitř nebo vně hostitelské rostliny, ale k samotnému kuklení dochází v půdě. Zralé larvy (Obr. 2.3) jsou světle žluté, velké 8 až 10 mm, zužují se směrem k hlavičce a skládají se z 11 segmentů.



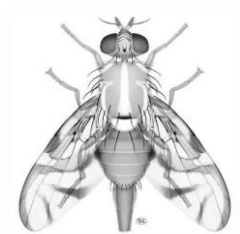
Obr. 2.3 Larva¹

Kukly (Obr. 2.4) velké 4,5 až 6 mm jsou zbarvené od matně žluté k načervenalé žluté až k tmavě červené, mají válcovitý tvar a skládají se, stejně jako larvy, z 11 segmentů.



Obr. 2.4 Kukla¹

Dospělci mají žlutohnědé zbarvení a jednotlivé formy tohoto druhu se odlišují vzory na křídlech. Identifikace dospělců je založena především na samičkách (Obr. 2.5), které mají kladélko¹. Velikost samičky se pohybuje v rozmezí 9 až 10 mm. Samečci jsou menší a jejich průměrná velikost je 8 mm.



Obr. 2.5 *Anastrepha fraterculus* – samička⁴

2.1.3 Reprodukční chování

Ovocné mouchy z čeledi Tephritidae jsou obvykle polygynní, což znamená, že sameček se páří s více samičkami². Některé mouchy z čeledi Tephritidae používají pro sexuální vábení zrakové, sluchové a chemické stimuly, přičemž hlavním stimulem je pravděpodobně sexuální feromon vylučovaný samečkou. Páření druhu *A. fraterculus* předchází shlukování sameček do rojů, námluvy a vylučování sexuálního feromonu.

Toto chování je podobné tomu, které bylo pozorováno u *A. ludens* a *A. suspensa*. Samečci při lákání samic mávají rychle křídly, která mají v pravém úhlu vzhledem k ose těla a orientované nahoru. Roje byly pozorovány zejména na částech stromů, kam dopadá nejvíce slunečního světla a byly tvořeny třemi až osmi jedinci, přičemž každý sameček byl na odděleném listovém uzlu nebo samotném listu. Páření bývá téměř vždy zahájeno mezi sedmou a devátou hodinou ranní na spodní straně listů. Samička si vybírá samečka a její přilet ke zvolenému samečkovi probíhá obvykle ve dvou fázích. Nejprve samička přistane asi 15 cm od samečka, potom se přibližuje k nehýbajícímu se samečkovi na vzdálenost asi 2 cm a v této pozici setrvává asi tři vteřiny a poté jí sameček přeskočí přes hlavu na její břicho. Pářící pár se okamžitě přesouvá na spodní stranu listu a páření může trvat několik minut až tři hodiny⁵.

Samičky divokého druhu *A. fraterculus* kladou vajíčka v průběhu celého dne, kdy došlo ke spáření, převážně do nezralých plodů hostitelské rostliny. Samičky chované v laboratoři kladou vajíčka až den po spáření². Larvy se po vylíhnutí živí dužnatými částmi plodů, čímž je činí nevhodnými pro lidskou spotřebu⁵.

Samičky *A. fraterculus* chované v laboratoři dosahují pohlavní dospělosti průměrně v 16,8 dnech, přičemž přibližně v tomto věku dochází také k jejich prvnímu páření. Samečci laboratorní populace *A. fraterculus* dospívají v 8 - 9 dnech, ale poprvé u nich dochází k páření ve věku $31,1 \pm 6,9$ dní². Průměrný věk pro první páření byl určen také u několika divokých druhů rodu *Anastrepha*. *A. pseudoparalella* se páří poprvé kolem 18. dne života, *A. obliqua* ve 21 dnech, *A. sorocula* ve 24 dnech a *A. bistrigata* ve 26 dnech⁶.

2.2 Semiochemikálie

Semiochemikálie jsou látky zodpovědné za chemický přenos informací mezi organismy⁷. Dělíme je na feromony, které zprostředkovávají vnitrodruhové komunikace a allelochemikálie zprostředkovávající mezidruhové komunikace.

2.2.1 Allelochemikálie

Allelochemikálie rozdělujeme na allomony, kairomony a synomony dle toho, pro koho je vysílaný signál výhodný⁸. Allomony jsou výhodné pro producenta a často jsou používány jako obrana proti predátorům. Kairomony jsou naopak výhodné pro příjemce, tudíž mnoho kairomonů pomáhá najít predátorům jejich kořist. Synomony

jsou výhodné pro producenta i příjemce, např. květy uvolňují vůně, které lákají opylovače.

2.2.2 Feromony

Slovo feromon bylo odvozeno z dvou řeckých slov "pherein" a "horman", která v překladu znamenají přenést a stimulovat⁹. Tento název navrhli Karlson a Butenandt pro chemické sloučeniny, které používají jedinci stejného druhu ke komunikaci mezi sebou. Feromony jsou produkovány ve žlázách s vnější sekrecí a ve většině případů jsou vylučovány jako kapalné látky, které se odpařují do okolního prostředí a hromadí se okolo producenta.

Z hlediska chemické struktury se ve feromonech vyskytuje mnoho strukturních typů, např. alifatické nenasycené sloučeniny, heterocyklické sloučeniny, makrocyclické sloučeniny, spiroketaly a terpeny⁷. Klíčovou roli má i stereochemické uspořádání těchto sloučenin. Enantiomery, polohové izomery nebo sloučeniny s různou konfigurací na dvojné vazbě mohou vyvolat u hmyzu odlišné chování a mají tedy jinou biologickou funkci¹⁰.

Existují dva odlišné typy feromonů - spouštěcí a primer feromony⁸. Spouštěcí feromony vyvolají okamžitou reakci hmyzu, zatímco primer feromony vyvolávají fyziologické změny u daného živočicha a až poté dojde ke změně jeho chování. Klasickým příkladem primer feromonu je kyselina (2*E*)-9-oxo-dec-2-enová, kterou produkuje královna včely medonosné. Tato látka potlačuje u včelích dělnic vývoj vaječníků. Spouštěcí feromony se dále rozdělují podle typu chování, které ovlivňují, na stopovací, poplašné, značkovací, mrtvolné a sexuální. Stopovací feromony používají zejména mravenci, všekazi a včely k označení nového zdroje potravy nebo nového místa k osídlení. Poplašné feromony značí převážně nebezpečí. Reakce hmyzu na poplašné feromony se liší v závislosti na jejich koncentraci. Nižší koncentrace přiláká hmyz směrem ke zdroji vylučovaného feromonu. Ale odpověď hmyzu na vyšší koncentraci velmi závisí na sociální organizaci kolonie. Méně organizované kolonie se dají na útěk, ale vysoce organizované budou vyšší koncentrací poplašného feromonu vybudeny k útoku. Značkovací feromony slouží zejména mravencům a včelám k označení oblasti, ve které se rozhodli usadit anebo k označení vstupu do hnízda. U některých druhů mravenců bylo pozorováno odstraňování zemřelých jedinců a odumírajícího materiálu z mraveniště. K tomu slouží mrtvolné feromony. Bylo zjištěno,

že velmi účinnou látkou vyvolávající toto chování je kyselina olejová. Pokud by živý mravenec šířil kyselinu olejovou, byl by považován za mrtvého.

Sexuální feromony jsou látky vylučované jedním pohlavím určitého druhu k přilákání partnera stejného druhu za účelem páření⁸. Některé složky sexuálního feromonu působí na delší vzdálenost, čímž přilákají partnera blíže. Po přiblížení se uplatňují složky sexuálního feromonu působící na krátkou vzdálenost a stimulují námluvy a páření¹¹. V roce 1939 se Adolf Butenandt se svými kolegy rozhodl, že izolují a identifikují látku lákající bource morušového. Příslušný feromon se jim podařilo identifikovat až v roce 1959. Účinná látka dostala název bombykol a řadou pokusů bylo zjištěno, že se jedná o hexadeka-10,12-dien-1-ol⁹. Sexuální feromony jsou stále intenzivně studovány, zejména u řádů Lepidoptera (motýli), Diptera (dvoukřídlí) a Coleoptera (brouci), vzhledem k jejich možnému použití ke kontrole populací těchto hmyzích škůdců⁸.

Sexuální feromony jsou vylučovány specializovanými žlázami, kterými jsou u rodu *Anastrepha* pleurální a zvětšené slinné žlázy. Pleurální žlázy jsou tvořené jednou vrstvou zvětšených, sloupcovitých epidermálních buněk nacházejících se v pleurální oblasti třetího, čtvrtého a pátého břišního segmentu a vyskytují se pouze u sameček. Slinné žlázy mají i samičky, ale nejsou zvětšené jako u sameček. Oba typy těchto žláz byly poprvé popsány u druhu *A. suspensa* a žlázy *A. fraterculus* jsou jim podobné. Pleurální žlázy sameček *A. fraterculus* jsou plně vyvinuty v pěti až osmi dnech a slinné žlázy v 10 dnech¹². Tělavé sloučeniny produkované v těchto žlázách jsou vylučovány ústním a análním otvorem, přičemž některé mohou být odpařovány přímo skrz kutikulu¹³.

2.2.3 Složení samčích feromonů u rodu *Anastrepha*

Tělavé sloučeniny vylučované samečky byly nejdříve zkoumány a identifikovány u karibského druhu *A. suspensa* a mexického druhu *A. ludens*¹⁴. Feromon *A. suspensa* obsahuje (3Z)-non-3-en-1-ol a (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-ol, které eluují současně jako jeden pík, dále suspensolid, β -bisabolen, anastrefin, epianastrefin a (Z)- β -ocimen¹³. Složky sexuálního feromonu *A. ludens* jsou (3Z)-non-3-en-1-ol, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-ol, anastrefin a epianastrefin¹⁵. Později bylo zjištěno, že feromon tohoto mexického druhu obsahuje také suspensolid¹⁶. Suspensolid byl poprvé izolován u samečka *A. suspensa* a identifikován jako

(3*E*,8*E*)-4,8-dimethyldeka-3,8-dien-10-olid¹⁷. *A. ludens* a *A. suspensa* vylučují tři stejné seskviterpeny a to α -farnesen, β -bisabolen a *trans*- α -bergamoten, jejichž poměry jsou u těchto dvou druhů odlišné. Rozdíl ve složení je pouze v tvorbě monoterpenů, protože *A. suspensa* produkuje (*Z*)- β -ocimen a *A. ludens* limonen¹⁶.

U druhu *A. suspensa* bylo zjištěno, že na složení a množství vylučovaného feromonu má vliv denní doba, věk a počet samců při jímání¹³. Brzy ráno je množství vylučovaných složek malé, později vzrůstá a v 11. až 13. hodině od východu slunce dosahuje maxima. Všechny složky feromonu se objevují poprvé u much starých čtyři dny, u much mladších jsou vylučovány pouze nonenoly. Maximální množství feromonu vylučovaly mouchy *A. suspensa* ve stáří sedm až devět dní. Bylo dokázáno, že izolovaný samec vyloučí více feromonu než samec ve skupině (po přepočtu na jednotlivce).

V samčím sexuálním feromonu druhu *A. fraterculus* jsou obsaženy dvě formy seskviterpeny α -farnesenu, a to jeho (*E*,*Z*) a (*Z*,*E*) izomery, tři laktony anastrefin, epianastrefin a (*E*,*E*)- α -suspensolid a dva monoterpeny limonen a (*Z*)- β -ocimen¹⁴. Zjistit kvantitativní složení feromonu *A. fraterculus* je důležité z toho důvodu, že by umožnilo vytvořit paraferomonové pastě, které by v kombinaci s toxickými látkami sloužily k lákání a hubení samečků. Počet samečků schopných páření by tak byl zredukován, což by mohlo vést k oslabení celkové populace¹⁸.

2.3 Metody izolace feromonů

Příprava vzorku je podstatnou součástí analýzy, protože špatně zvolená technika, zvláště při analýze těkavých látek, může způsobit jejich ztráty¹⁹. Při izolaci feromonů byly dříve používány hlavně tyto tři metody: extrakce homogenizovaných žláz rozpouštědlem, oplachování žláz rozpouštědlem a destilace suspenzí nebo homogenátů částí hmyzích těl vodní parou, po které následovala extrakce rozpouštědlem. Tyto techniky byly v mnoha případech užitečné, ale vyžadovaly velké množství rozpouštědel a hmyzu. Byly proto z velké části nahrazeny metodami, u kterých stačí několik hmyzích jedinců a mnohem méně rozpouštědla⁸. Mezi tyto metody patří headspace techniky, nástřik pevného vzorku a mikroextrakce pevnou fází.

2.3.1 Extrakce žláz rozpouštědlem

Před samotnou extrakcí je nutné vypreparovat příslušnou žlázu nebo lze použít i celého jedince. Pro extrakci je podstatný výběr rozpouštědla. Rozpouštědlo pro zakonzentrování extraktů musí být dostatečně těkavé, aniž by muselo být vystaveno vysokým teplotám. Proto jsou nejčastěji používanými rozpouštědly dichlormethan, hexan a diethylether. Konkrétní podmínky extrakce závisí na velikosti hmyzu a na znalosti či neznalosti místa produkce feromonu²⁰. Nevýhodou této metody izolace je i vyextrahování látek neferomonové povahy, které se také nacházejí ve žlázách¹⁴.

2.3.2 Headspace technika

Nejvhodnější metodou pro odběr vzorků při použití živého hmyzu je tzv. headspace technika, protože se do vzorků nedostanou nečistoty ze žláz, jako je tomu při extrakci¹⁴. Existují dvě provedení a to statický a dynamický headspace²¹. Při statickém headspace je vzorek v uzavřené nádobě zahříván na určitou teplotu, při které jsou těkavé látky shromážděny nad vzorkem, následně jsou odebrány a nadávkovány na kolonu plynového chromatografu²².

Pro vzduchem šířené feromony se používá dynamický headspace (Obr. 2.6), při které proudí vzduch přes komoru s živým hmyzem a těkavé látky jsou zachytávány na adsorbent a poté eluovány vhodným rozpouštědlem nebo tepelně desorbovány. Jako adsorbent se běžně používá aktivní uhlí nebo porézní polymery jako jsou Poropak-Q, Haysep-Q[®], Super-Q[®] nebo Tenax-TA. Všechny adsorbenty musí být před použitím pročištěny a aktivovány kvůli zefektivnění zachytu látek a minimalizaci nečistot ve vzorcích²³.

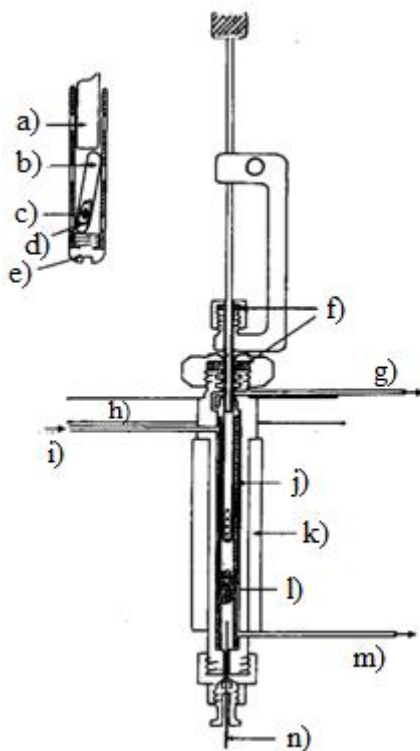


Obr. 2.6 Schéma dynamického headspace se zachytem látek na adsorbent

Další možný způsob zachytu těkavých látek je kryogenní zachyt, při kterém jsou těkavé látky nesené proudem vzduchu přiváděny do Erlenmayerovy baňky ponořené v nádobě s kapalným dusíkem, kde kondenzují a mohou být odebrány k analýze²⁰.

2.3.3 Technika nástřiku pevného vzorku

Tato technika (Obr. 2.7) nabízející přímé dávkování vzorku bez použití rozpouštědel byla vymyšlena Morganem a Wadhamsem⁸. Při této technice je hmyzí tkáň obsahující feromony (žlázy, tykadla, křídla nebo kutikula) uzavřena do skleněné kapiláry, která je umístěna do vzorkovače napojeného na dávkovač plynového chromatografu. Kapilára je následně rozdrcena a těkavé látky jsou spolu s nosným plynem přiváděny na kolonu.



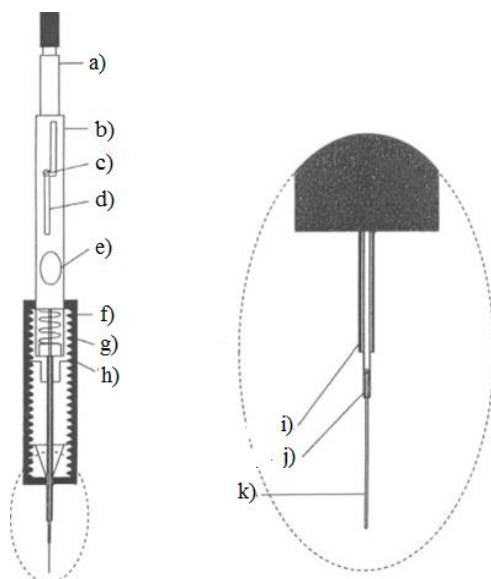
Obr. 2.7 Schéma nástřiku pevného vzorku⁸

a) píst, b) skleněná kapilára, c) tkáň nebo žláza, d) úlomek skla, e) šroub pro odstraňování nečistot, f) silikonová těsnění, g) čistící septum, h) kryt pícky, i) nosný plyn, j) skleněná vložka, k) ohřívač vstřikování, l) zátka ze skelné vaty, m) rozdělovací ventil, n) kapilární kolona

2.3.4 Mikroextrakce pevnou fází

Mikroextrakce pevnou fází (solid-phase microextraction, SPME) je velmi jednoduchá a účinná metoda přípravy vzorku, která byla vyvinuta v roce 1989 Pawliszynem (Obr. 2.8). Tato metoda spojuje vzorkování, extrakci a zakoncentrování vzorku do jednoho kroku a to bez použití rozpouštědel¹⁹. Analyty jsou sorbovány na křemenném vlákne pokrytém stacionární fází o různé polaritě, dokud není dosaženo

rovnováhy²⁴. Tato technika se běžně používá ve spojení s plynovou chromatografií pro analýzu těkavých látek a také ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií pro analýzu slabě těkavých nebo termolabilních látek¹⁹.



Obr. 2.8 Schéma SPME¹⁹

a) píst, b) barel, c) šroub upevňující píst, d) Z-šterbina, e) středové okénko, f) nastavitelná jehla, g) napínání pružiny, h) těsnící septum, i) jehla, j) upevnění vlákna, k) křemenné vlákno

2.4 Analytické metody identifikace feromonů

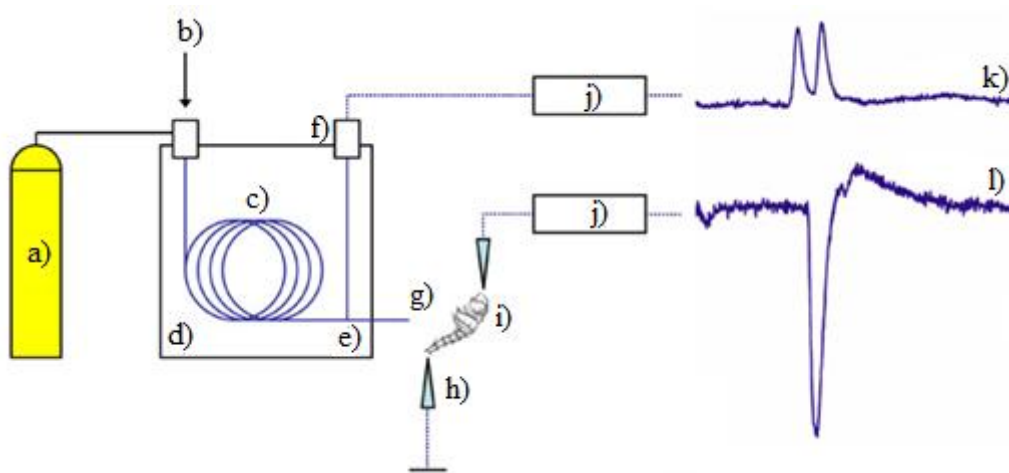
Feromony jsou produkovány ve velmi malém množství pohybujícím se v řádech pikogramů až nanogramů²⁵. Jejich identifikace je z toho důvodu problematická. Pro identifikaci feromonů se nejčastěji používá spojení plynové chromatografie s hmotnostní nebo elektroantenografickou detekcí. Identifikaci může znemožnit přítomnost vyššího množství neaktivního materiálu tím, že překryje biologicky aktivní materiál.

2.4.1 Elektroantenografie

Elektroantenografie využívá hmyzího tykadla, na němž se nachází čichové receptorové buňky, ke stanovení biologické aktivity feromonů⁷. Tuto metodu vyvinul v roce 1957 Schneider, který prováděl elektrofyziologické pokusy s tykadlem bource morušového. Tykadlo je umístěno mezi dvě skleněné mikroelektrody napojené na zesilovač a zařízení, které zaznamenává změny potenciálů čichových buněk²⁰.

Amplituda odpovídá reakci tykadla na konkrétní sloučeninu²⁵. U této analýzy dochází k reakci tykadla nejen v případě atrakce, ale i v případě iritace²⁰.

Spojení s plynovým chromatografem přináší možnost použití k identifikaci feromonů. První přímé spojení těchto dvou metod bylo publikováno v roce 1975 Arnem²⁰. Jedná se o poměrně jednoduchý systém (Obr. 2.9) založený na běžném plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem. Jedinou podstatnou změnou v systému je přítomnost rozdělovače, který jednu polovinu eluátu vede na plamenově ionizační detektor a druhou na elektroantenografický detektor²⁵.



Obr. 2.9 Schéma plynového chromatografu s elektroantenografickou detekcí²⁵

a) nosný plyn, b) nástřik vzorku, c) kolona, d) termostat kolony, e) rozdělovač, f) plamenově ionizační detektor, g) elektroantenografický detektor, h) skleněná mikroelektroda, i) hmyzí tykadlo, j) zesilovač, k) záznam z FID, l) záznam z EAD

2.4.2 Plynová chromatografie

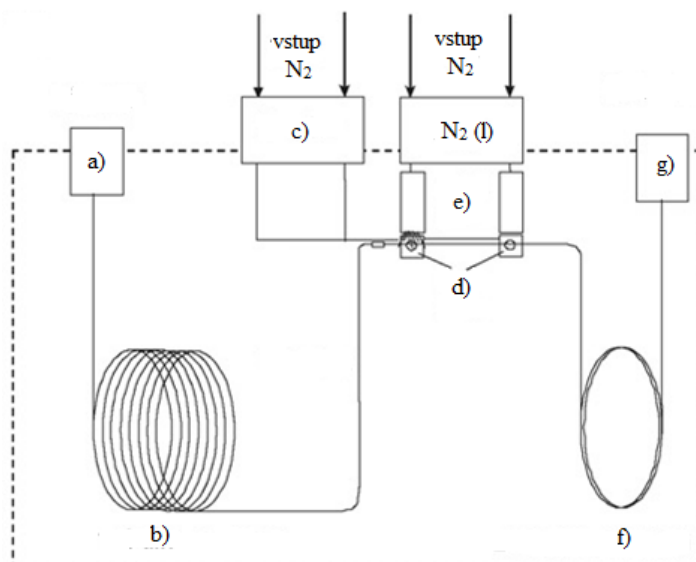
Plynová chromatografie je důležitou technikou používanou pro separaci feromonových složek, která poskytuje potřebné vysoké rozlišení²⁰, ale přesto často nestačí k úplnému rozdělení složitějších vzorků²⁶. Jako nosný plyn je používáno převážně helium, protože poskytuje vhodné retenční časy látek²⁰.

Pro separaci se používají polární i nepolární polysiloxanové fáze²³. Nepolární polysiloxanové fáze jsou upřednostňovány z důvodu jejich široké škály, tepelné stability a dlouhé životnosti. Nejčastěji používanými pro analýzu feromonů jsou 100% polydimethylsiloxanová a 5% polyfenylmethylsiloxanová fáze.

Nejběžnějším detektorem používaným při analýze feromonů je vysoce citlivý plamenově ionizační detektor poskytující lineární odezvy v širokém rozsahu koncentrací a mající téměř univerzální detekční schopnosti²². V dnešní době je často využíváno i mnoho typů hmotnostních detektorů, přičemž pro analýzu feromonů se nejvíce využívá kvadrupól a iontová past.

2.4.3 Dvojdimenzionální plynová chromatografie

Dvojdimenzionální plynová chromatografie je analytická metoda, kterou vyvinuli Liu a Phillips za účelem zlepšení separace látek ze směsi²⁷. Používá se ke zjištění složení složitějších směsí obsahujících analyty o velmi nízkých koncentracích v řádech pikogramů až nanogramů. Nabízí řešení problému současné eluce více látek a poskytuje vysokou citlivost a selektivitu. Plynový chromatograf (Obr. 2.10) obsahuje dvě kolony různé polarity, mezi kterými je umístěn modulátor²⁸.



Obr. 2.10 Schéma dvojdimenzionálního plynového chromatografu²⁶

a) dávkovač, b) primární kolona, c) ohříváč, d) horké trysky, e) studené trysky, f) sekundární kolona, g) detektor

Hlavní funkcí modulátoru je zachytávat a kondenzovat sloučeniny eluující z primární kolony a následně je periodicky uvolňovat na sekundární kolonu jako krátké pulzy²⁶. Nejčastěji se ke kondenzaci látek používá chlazení oxidem uhličitým nebo kapalným dusíkem. První navržený kryomodulátor byl pohyblivý a poháněný pístem. Existují

i nepohyblivé modulátory, které se začínají využívat více než pohyblivé modulátory právě kvůli absenci pohyblivých částí.

Ve spojení s GC×GC se používá zejména průletový analyzátor²⁷. Tento analyzátor je jednoduchý, ale extrémně citlivý, použitelný téměř pro neomezený rozsah hmotností iontů a také je při jeho použití analýza velmi rychlá. Mohou být naměřeny řádově stovky spekter za sekundu. Ionty jsou přiváděny z iontového zdroje jako krátký pulz, čímž všechny získají při vstupu do analyzátoru stejnou kinetickou energii. Při průchodu analyzátorovou trubicí jsou ionty rozděleny podle jejich hmotnosti, přičemž ty lehčí se dostávají na detektor rychleji²⁵.

Nevýhodou této metody je vysoká pořizovací cena vybavení a také drahý chod a údržba²⁷. Cenu přístroje zvyšuje až na dvojnásobek modulátor. Vzhledem k tomu, na jakém principu pracuje modulátor, je pro analýzy potřeba velké množství kapalného dusíku nebo oxidu uhličitého.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Tab. 3.1 Seznam použitých chemikálií

Název a čistota chemikálie	Výrobce
destilovaná voda Milli-Q	ÚOCHB AV ČR
ethanol p.a.	Penta
<i>n</i> -hexan p.a.	Lach-Ner
<i>n</i> -tetrakosan p.a.	Fluka
aceton p.a.	Penta
<i>n</i> -alkany (C ₈ - C ₂₂)	Sigma-Aldrich
dusík, helium	Messer

3.2 Přístroje

Pro dynamický headspace byla použita nízkoprůtoková odběrová čerpadla Pocket Pump 210 (SKC, USA). Filtry byly vypékány v horkovzdušné troubě, pro jejichž umístění byly zabudovány speciální držáky (ASEL, HR).

Pro analýzu vzorků těkavých látek byl použit dvojdimenzionální plynový chromatograf s průletovým analyzátozem a hmotnostní detekcí Pegasus 4D (LECO, USA). Chromatograf byl vybaven primární kolonou DB-5 (nepolární) o rozměrech 30 m × 250 μm i.d. × 0,25 μm (vrstva 5% fenylmethylpolysiloxanové fáze) a sekundární kolonou BPX-50 (středně polární) o rozměrech 2 m × 100 μm × 0,1 μm (vrstva 50% fenylpolysilfenylsiloxanové fáze). Mezi kolonami je modulátor skládající se ze čtyř trysek vedoucích plynný dusík, přičemž dvě jsou chlazené kapalným dusíkem a dvě vyhřívané.

3.3 Biologický materiál

Mouchy *A. fraterculus* pro pokusy pocházely z laboratorního chovu entomologické laboratoře FAO/IAEA v rakouském Seibersdorfu a byly dopraveny ve stadiu kukly. Po vylíhnutí byly mouchy rozděleny dle pohlaví do dvou skleněných terárií, opatřených silonovými návleky, aby bylo zamezeno úniku much. Samičky byly rozpoznány podle

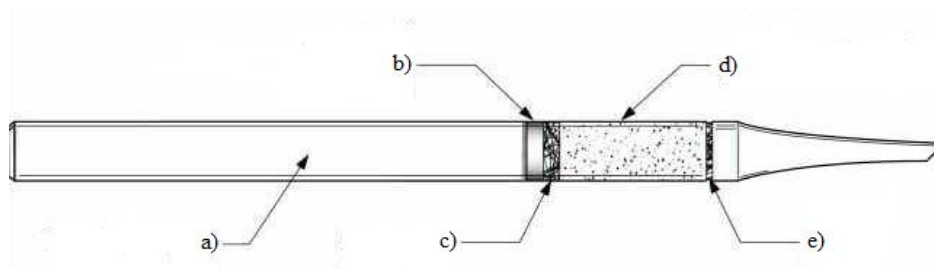
kladélka. Cirkadiánní cyklus byl nastaven na 14:10. Teplota v laboratoři byla nastavena na 27,5 °C a relativní vlhkost byla přibližně 70 %.

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Odběr vzorků

Pro odběr vzorků byl použit postup dle Nationa²⁹, který byl přizpůsoben místním možnostem a potřebám. Jímání látek bylo provedeno u sameček starých 5, 7, 12, 15, 20, 22, 26 a 30 dní. V každém tomto stáří byla vždy provedena čtyři současně probíhající jímání. Tři jímání s deseti samečky a jedno jímání bylo slepým pokusem. Na aparatury pro jímání vzorků se používaly 100 ml baňky s kulatým dnem, promývačky, filtry, hadičky, svorky a teflonová páska. Chemické nádobí muselo být před každým pokusem dokonale čisté, proto bylo před sestavením aparatury řádně umyto, vypláchnuto ethanolem, poté destilovanou vodou a nakonec se nechalo jednu hodinu vypéct v troubě nastavené na 150 °C. Aparatury byly sestaveny tak, že se na promývačky nasadily kousky teflonových hadiček, do kterých byly umístěny filtry (vstupní špičkou a výstupní koncem), které byly ještě upevněny teflonovou páskou. Do každé baňky byla dána jako potrava lžička třtinového cukru a vialka s namočenou vatou sloužící mouchám k pití. Do každé ze tří baněk bylo nachytáno deset sameček a baňky byly uzavřeny promývačkou. Baňky s promývačkou byly upevněny svorkami. Čtvrtá baňka obsahovala jen třtinový cukr a vialku s namočenou vatou sloužící jako slepý pokus. Na výstupní filtry všech baněk byly připojeny pumpy s průtokem vzduchu 100 ml/min. Jímání trvalo pokaždé 24 h.

Výstupní filtry (Obr. 3.1) obsahovaly 30 mg adsorbentu Super-Q[®] (polymer na bázi divinylbenzenu a ethylvinylbenzenu²¹).



Obr. 3.1 Filtr pro záchyt těkavých látek³⁰

a) borosilikátová trubička s vnějším průměrem 6,4 mm, b) teflonový kroužek, c) borosilikátová skelná vata, d) 30 mg Super-Q[®], e) sítko z nerezové oceli s hustotou 400 ok na palec

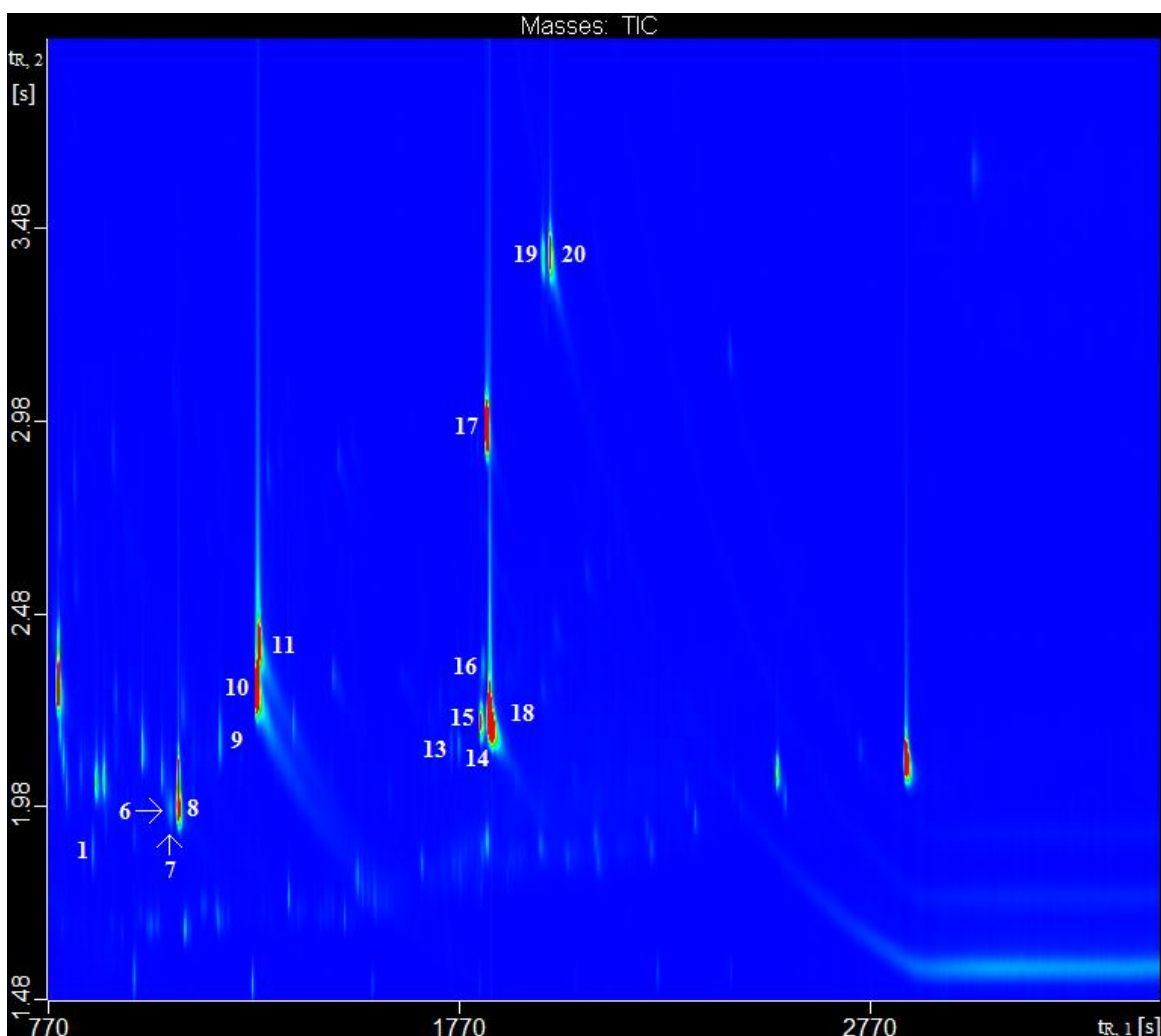
Látky zachycené na adsorbentu byly eluovány 500 μ l roztoku hexanu s vnitřním standardem tetrakosanem o koncentraci 5 μ g/ml. Filtry byly před dalším použitím propláchnuty 12 ml acetonu a 60 minut vypékány ve speciální horkovzdušné troubě při teplotě 150 °C.

3.4.2 Analýza vzorků metodou GC×GC-MS

Pro nástřik vzorků byl použit automatický dávkovač. Dávkovaný objem byl pokaždé 1 μ l. Teplota nástřiku byla 220 °C. Teplotní program primární kolony byl nastaven v rozsahu teplot od 40 do 270 °C, přičemž teplota 40 °C byla udržována 2 minuty a dále se zvyšovala o 0,5 °C/min až do dosažení 270 °C. Teplotní program sekundární kolony byl 10 °C nad teplotním programem primární kolony a měl stejný průběh. Za těchto podmínek byla nejprve analyzována série alkanů C₈ - C₂₂ o koncentraci 1·10⁻³ μ g/ml. Poté byly analyzovány všechny vzorky. Analýzou byly získány dvojdimenzionální chromatogramy. Chromatogram série alkanů byl manuálně vyhodnocen (určení středů píků), čímž byly zjištěny retenční časy, které byly použity k automatickému vyhodnocení ostatních vzorků. Automatické vyhodnocení vzorků bylo provedeno pomocí softwaru ChromaTOF[®].

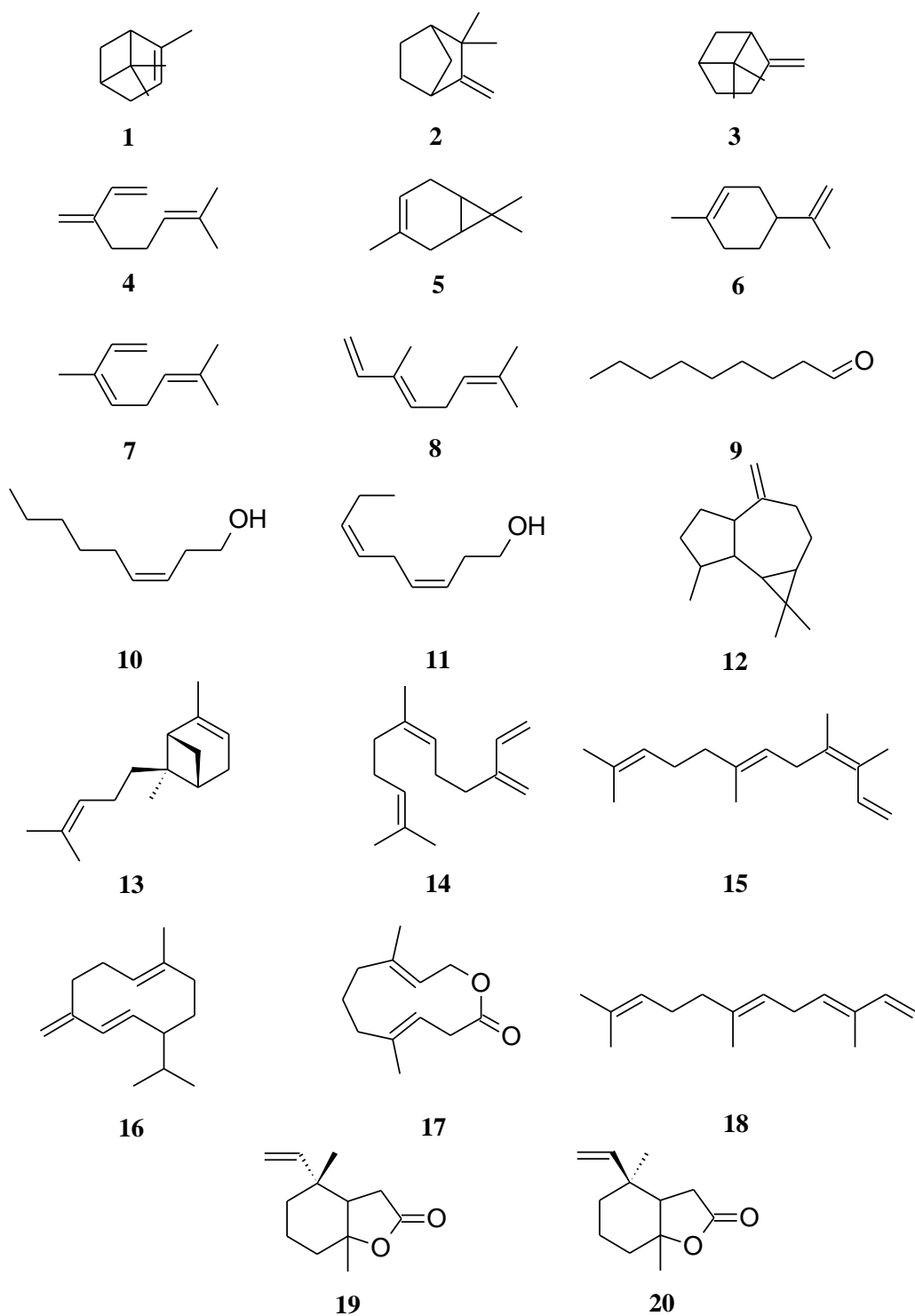
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Získané dvojdimenzionální chromatogramy vzorků byly nejprve porovnány s chromatogramy slepých pokusů, aby byly vyloučeny balastní látky. Porovnáním naměřených hmotnostních spekter se spektry knihovními bylo zjištěno, že samečci *A. fraterculus* vylučují dvacet těkavých látek, z toho čtrnáct terpenů: α -pinen **1**, kamfen **2**, β -pinen **3**, myrcen **4**, Δ^3 -karen **5**, limonen **6**, (*Z*)- β -ocimen **7**, (*E*)- β -ocimen **8**, aromadendren **12**, *trans*- α -bergamoten **13**, (*Z*)- β -farnesen **14**, (*Z,E*)- α -farnesen **15**, germakren D **16**, (*E,E*)- α -farnesen **18**; jeden aldehyd: nonanal **9**; dva alkoholy: (3*Z*)-non-3-en-1-ol **10**, (3*Z*,6*Z*)-nona-3,6-dien-1-ol **11** a tři laktony: suspensolid **17**, anastrefin **19** a epianastrefin **20**. Na obr. 4.1 je ukázka dvojdimenzionálního chromatogramu s vyznačením některých identifikovaných látek.



Obr. 4.1 Ukázka dvojdimenzionálního chromatogramu

Níže (Obr. 4.2) jsou uvedeny struktury všech identifikovaných látek.



Obr. 4.2 Strukturní vzorce látek obsažených v sexuálním feromonu *A. fraterculus*

Systematické i triviální názvy identifikovaných těkavých látek spolu s jejich retenčním chováním (retenční časy v první $t_{R,1}$ a druhé dimenzi $t_{R,2}$ [s], Kovatsovy indexy KI) jsou shrnuty v tab. 4.1. Pro výpočet Kovatsových indexů bylo potřeba zjistit i retenční časy série standardů n-alkanů. Vztah pro výpočet je totiž následující

$$KI = [100 \cdot (\log t'_{R,x} - \log t'_{R,n}) / (\log t'_{R,n+1} - \log t'_{R,n})] + 100 \cdot n \quad (4.1)$$

kde je $t'_{R,x}$ redukovaný retenční čas analytu, $t'_{R,n}$ redukovaný retenční čas n-alkanu eluujícího před analytem, $t'_{R,n+1}$ redukovaný retenční čas n-alkanu eluujícího za analytem³¹. Pro porovnání jsou v tab. 4.1 uvedeny i publikované Kovatsovy indexy^{32,33}.

Tab. 4.1 Retenční chování těkavých látek identifikovaných metodou GC×GC-MS

Č.	Systematický název	Triviální název	KI ^a	KI ^b	t _{R, 1} [s]	t _{R, 2} [s]
1	2,6,6-trimethylbicyklo[3.1.1]hept-2-en	α -pinen	941	939	878	1,87
2	2,2-dimethyl-3-methylenbicyklo[2.2.1]heptan	kamfen	957	953	910	1,94
3	6,6-dimethyl-2-methylenbicyklo[3.1.1]heptan	β -pinen	985	980	964	1,99
4	7-methyl-3-methylenookta-1,6-dien	myrcen	992	991	976	1,92
5	3,7,7-trimethylbicyklo[4.1.0]hept-3-en	Δ^3 -karen	1016	1011	1022	1,97
6	1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyklohexen	limonen	1035	1031	1056	2,00
7	(3Z)-3,7-dimethylokta-1,3,6-trien	(Z)- β -ocimen	1039	1037	1064	1,98
8	(3E)-3,7-dimethylokta-1,3,6-trien	(E)- β -ocimen	1052	1050	1088	1,99
9	nonanal	-	1107	1098	1188	2,15
10	(3Z)-non-3-en-1-ol	-	1166	-	1292	2,23
11	(3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-ol	-	1168	-	1296	2,35
12	1,1,7-trimethyl-4-methylenedekahydro-(1H)-cyklopropa[e]azulen	aromadendren	1431	1439	1722	2,26
13	2,6-dimethyl-6-(4-methylpent-3-enyl)-bicyklo[3.1.1]hept-2-en	<i>trans</i> - α -bergamoten	1450	1436	1750	2,13
14	(6Z)-7,11-dimethyl-1,6,10-dodekatrien	(Z)- β -farnesen	1464	1443	1770	2,13
15	(3Z,6E)-3,7,11-trimethyl-1,3,6,10-dodekatetraen	(Z,E)- α -farnesen	1500	-	1824	2,20
16	(1E,6E)-1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-cyklodeka-1,6-dien	germakren D	1503	1485	1828	2,35
17	(3E,8E)-4,8-dimethyldeka-3,8-dien-10-olid	suspensolid	1512	-	1840	2,96
18	(3E,6E)-3,7,11-trimethyldodeka-1,3,6,10-tetraen	(E,E)- α -farnesen	1521	1508	1854	2,19
19	(4R)-4-ethenyl-4,7a-dimethylhexahydro-1-benzofuran-2(3H)-on	anastrefin	1612	-	1974	3,39
20	(4S)-4-ethenyl-4,7a-dimethylhexahydro-1-benzofuran-2(3H)-on	epianastrefin	1628	-	1998	3,37

^a zjištěné Kovatsovy indexy identifikovaných látek pro kolonu DB-5^b publikované Kovatsovy indexy pro kolonu DB-5

Pro kvantitativní analýzu byla použita metoda vnitřního standardu, při níž je do vzorku přidáváno známé množství vnitřního standardu. Vztah pro výpočet množství analytu ve vzorku je

$$m_{AV} = (A_{AV} / A_{VS}) \cdot m_{VS} \cdot f \quad (4.2)$$

kde je m_{AV} množství analytu ve vzorku, A_{AV} plocha píku analytu ve vzorku, A_{VS} plocha píku vnitřního standardu ve vzorku, m_{VS} množství vnitřního standardu ve vzorku, f poměr odezvových faktorů. Pro výpočet poměru odezvových faktorů je vztah

$$f = (A_{VS} / A_{AS}) \cdot (m_{AS} / m_{VS}) \quad (4.3)$$

kde je A_{VS} plocha píku vnitřního standardu ve vzorku, A_{AS} plocha píku standardu analytu, m_{AS} množství standardu analytu, m_{VS} množství vnitřního standardu ve vzorku^{34,35}. Pro použití vztahu (4.2) je nutná znalost odezvových faktorů jednotlivých látek. K jejich zjištění by byly potřeba syntetické standardy identifikovaných látek, jejichž pořizovací cena by byla poměrně vysoká a následné stanovení odezvových faktorů by bylo časově náročné. V mém případě byly odezvové faktory identifikovaných těkavých látek považovány za shodné s odezvovým faktorem vnitřního standardu, proto byl ze vztahu (4.2) pro výpočet vynechán poměr odezvových faktorů.

V níže uvedených tabulkách (Tab 4.2, 4.3 a 4.4) jsou vypočítaná průměrná množství jednotlivých těkavých složek m_{1-20} a jejich směrodatné odchylky σ ze třech měření. Tato množství odpovídají produkci deseti samečků za 24 h. Přepočet na produkci jednoho samečka za 1 h není možný, protože oba tyto faktory mají na množství vyprodukovaných látek vliv, jak je uvedeno v literatuře¹². Výjimka nastala při jímání provedeného u much starých 12, 20 a 26 dní, kdy muselo být vždy jedno měření vyloučeno. V případě jímání 12. den od vykuklení bylo jedno měření vyloučeno z toho důvodu, že během pokusu vypadl vstupní filtr. V případě jímání 20. a 26. den od vykuklení není příčina nepovedeného měření známa, ale je možné, že byly v aparatuře pro dynamický headspace špatně upevněny filtry.

Tab. 4.2 Průměrné množství m_{1-7} a směrodatné odchylky σ složek **1-7** sexuálního feromonu při uvedeném stáří much

Stáří [dny]	$m_1 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_2 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_3 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_4 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_5 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_6 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_7 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$
5	$0,36 \pm 0,09$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,00$	$0,41 \pm 0,11$	$0,00 \pm 0,00$
7	$0,55 \pm 0,37$	$0,05 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,11$	$0,10 \pm 0,07$
12 ^b	$0,07 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,61$
15	$0,12 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,09$
20 ^b	$0,23 \pm 0,19$	$0,02 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,11$	$0,37 \pm 0,07$
22	$0,43 \pm 0,20$	$0,04 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,04$	$1,47 \pm 0,65$	$0,32 \pm 0,10$
26 ^b	$0,11 \pm 0,04$	$0,01 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,10$
30	$0,48 \pm 0,08$	$0,03 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,00$	$2,03 \pm 0,12$	$0,17 \pm 0,06$

^a množství odpovídající produkci 10 samečků za 24 h

^b průměrné množství bylo vypočteno pouze ze dvou hodnot

Tab. 4.3 Vypočtené množství m_{8-14} a směrodatné odchylky σ složek **8-14** sexuálního feromonu při uvedeném stáří much

Stáří [dny]	$m_8 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_9 \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{10} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{11} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{12} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{13} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{14} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$
5	$0,19 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,17$	$0,22 \pm 0,11$	$0,13 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$
7	$1,93 \pm 1,12$	$0,27 \pm 0,12$	$3,36 \pm 2,06$	$2,84 \pm 1,78$	$0,06 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,07$
12 ^b	$1,22 \pm 0,92$	$0,16 \pm 0,03$	$3,92 \pm 0,92$	$1,74 \pm 0,44$	$0,01 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,01$
15	$5,47 \pm 0,89$	$0,14 \pm 0,04$	$5,35 \pm 1,57$	$2,15 \pm 0,68$	$0,01 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,05$
20 ^b	$4,24 \pm 2,51$	$0,19 \pm 0,06$	$3,31 \pm 0,87$	$1,11 \pm 0,22$	$0,03 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,00$
22	$3,81 \pm 2,60$	$0,30 \pm 0,10$	$4,82 \pm 0,44$	$0,90 \pm 0,13$	$0,05 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,06$
26 ^b	$4,73 \pm 2,83$	$0,14 \pm 0,03$	$4,55 \pm 1,02$	$0,55 \pm 0,12$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,05$
30	$2,68 \pm 0,14$	$0,17 \pm 0,05$	$2,77 \pm 0,81$	$0,21 \pm 0,08$	$0,03 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,03$

^a množství odpovídající produkci 10 sameček za 24 h

^b průměrné množství bylo vypočteno pouze ze dvou hodnot

Tab. 4.4 Vypočtené množství m_{15-20} a směrodatné odchylky σ složek **15-20** sexuálního feromonu v každém dni jímání

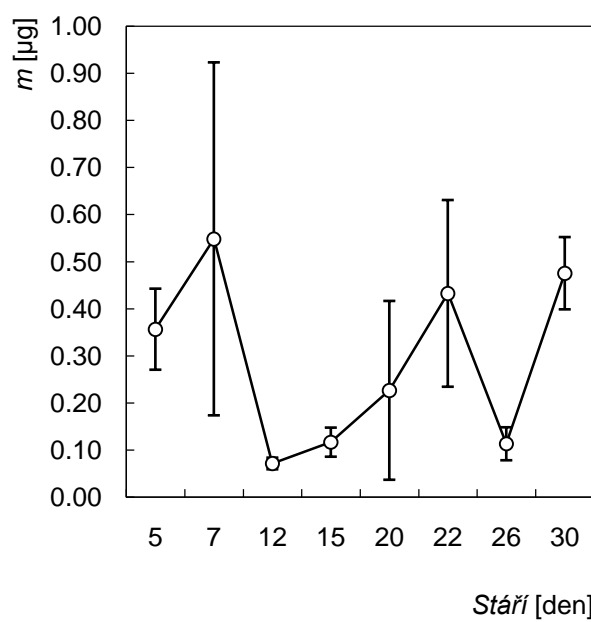
Stáří [dny]	$m_{15} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{16} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{17} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{18} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{19} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$	$m_{20} \pm \sigma [\mu\text{g}]^a$
5	$0,09 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,32$	$1,04 \pm 1,02$	$0,02 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,09$
7	$0,88 \pm 0,63$	$0,16 \pm 0,08$	$2,89 \pm 1,97$	$11,74 \pm 9,87$	$0,28 \pm 0,18$	$0,98 \pm 0,65$
12 ^b	$0,63 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,02$	$3,30 \pm 0,08$	$7,37 \pm 0,57$	$0,35 \pm 0,06$	$1,13 \pm 0,20$
15	$1,74 \pm 0,42$	$0,09 \pm 0,02$	$4,43 \pm 1,07$	$8,14 \pm 1,51$	$0,44 \pm 0,12$	$1,29 \pm 0,56$
20 ^b	$1,67 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,02$	$3,98 \pm 0,24$	$15,87 \pm 10,37$	$0,57 \pm 0,04$	$1,99 \pm 0,11$
22	$1,65 \pm 0,38$	$0,06 \pm 0,02$	$4,25 \pm 0,72$	$9,60 \pm 6,93$	$0,58 \pm 0,05$	$1,52 \pm 0,75$
26 ^b	$1,33 \pm 0,38$	$0,06 \pm 0,00$	$3,52 \pm 0,73$	$4,34 \pm 0,87$	$0,48 \pm 0,13$	$1,75 \pm 0,41$
30	$0,97 \pm 0,17$	$0,06 \pm 0,02$	$2,18 \pm 0,40$	$12,23 \pm 6,89$	$0,35 \pm 0,07$	$1,12 \pm 0,24$

^a množství odpovídající produkci 10 sameček za 24 h^b průměrné množství bylo vypočteno pouze ze dvou hodnot

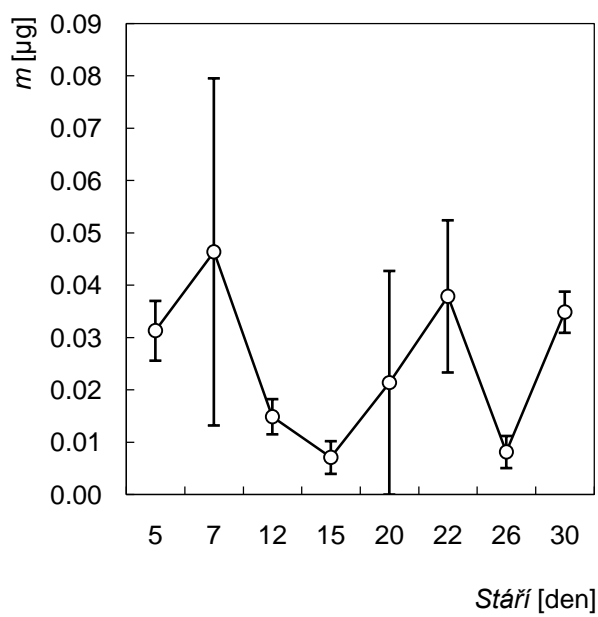
Z vypočtených hodnot byl pro každou identifikovanou látku sestaven graf (Obr. 4.3a – 4.3t) závislosti množství emitované látky na stáří much. Grafy jsou seřazeny podle eluce jednotlivých látek.

S ohledem na prezentované výsledky je možno rozdělit identifikované látky (Tab. 4.1) do dvou skupin. První skupinu tvoří látky, u nichž nebyla prokázána antenální aktivita a které vykazují nerovnoměrně kolísavý trend koncentrace v závislosti na stáří. Druhá skupina zahrnuje látky antenálně aktivní, které jsou z hlediska behaviorální aktivity velice významné a jejich koncentrace v závislosti na stáří odpovídá hypotéze, že produkce feromonu se zvyšuje proporcionálně se stářím.

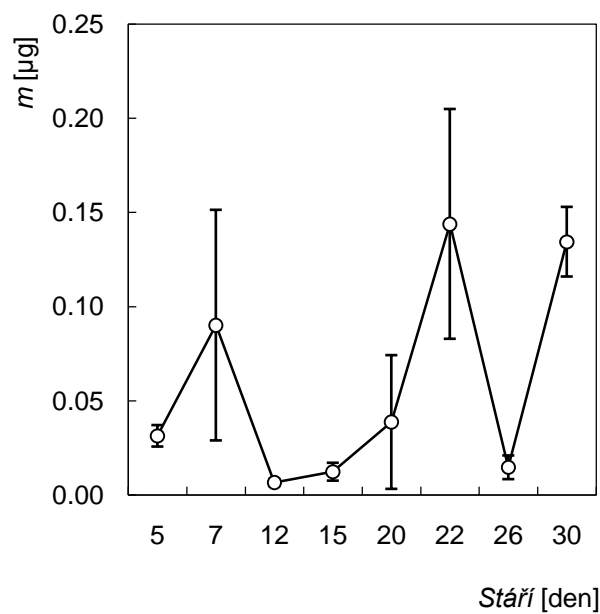
Látky s kolísavým trendem jsou převážně monoterpeny, seskviterpeny a aldehyd, které pravděpodobně nemají vliv na chování a v této diplomové práci u nich nebyla prokázána antenální aktivita. Velmi mladé mouchy (5 dní staré) produkovaly vysoké množství myrcenu (Obr. 4.3d), nonanal (Obr. 4.3i), aromadendrenu (Obr. 4.3l) a *trans*- α -bergamotenu (Obr. 4.3m). Již 7. den po vylíhnutí, kdy mouchy nejsou ještě pohlavně dospělé, bylo emitováno maximální množství α -pinenu (Obr. 4.3a), kamfenu (Obr. 4.3b), Δ^3 -karenu (Obr. 4.3e) a také germakrenu D (Obr. 4.3p). Trend germakrenu D se však od výše uvedených látek liší, protože od 20. dne je jeho množství v podstatě konstantní. Sexuálně dospělí samci (20. - 22. den po vylíhnutí) produkovali maximum množství β -pinenu (Obr. 4.3c), myrcenu (Obr. 4.3d), (*Z*)- β -farnesenu (Obr. 4.3n) a nonanal (Obr. 4.3i).



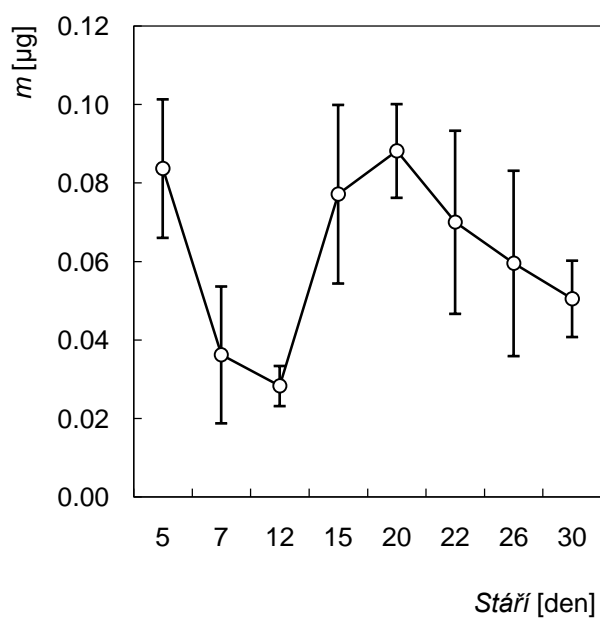
Obr. 4.3a Graf závislosti množství α -pinenu **1** na stáří much



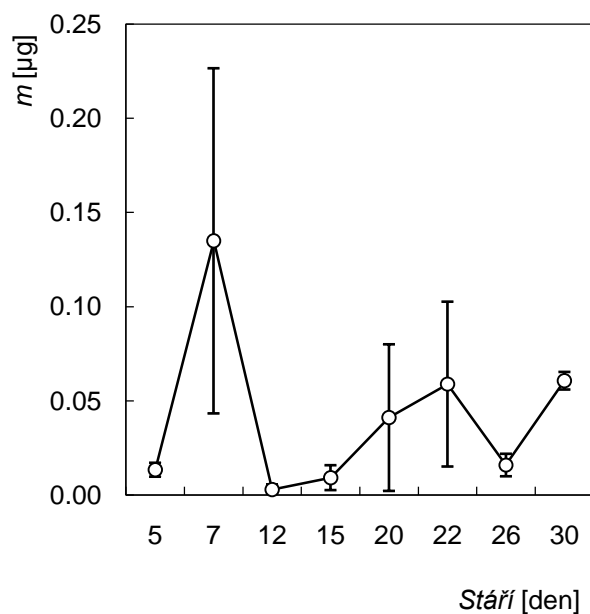
Obr. 4.3b Graf závislosti množství kamfenu **2** na stáří much



Obr. 4.3c Graf závislosti množství β -pinenu **3** na stáří much

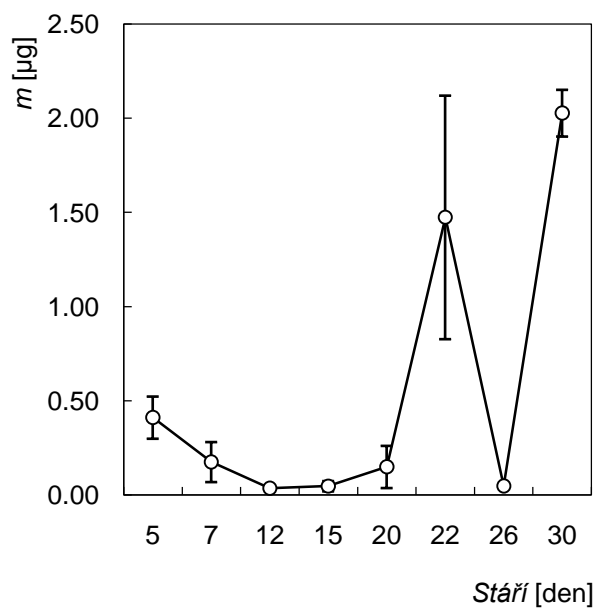


Obr. 4.3d Graf závislosti množství myrcenu **4** na stáří much



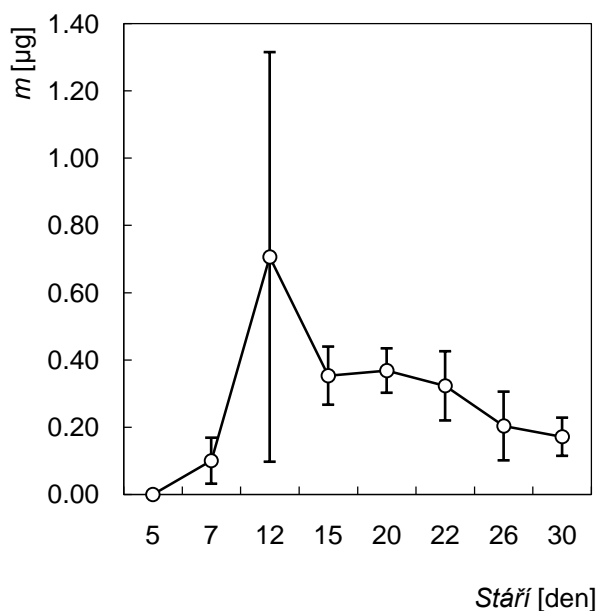
Obr. 4.3e Graf závislosti množství Δ^3 -karenu **5** na stáří much

Množství limonenu (Obr. 4.3f) je také kolísavé v závislosti na věku a maxima dosahuje až 30. den, což úplně popírá teorii, že po dosažení optimální zralosti dochází později k poklesu emitovaného množství látek. Limonen byl dříve identifikován u *A. ludens*¹⁶.



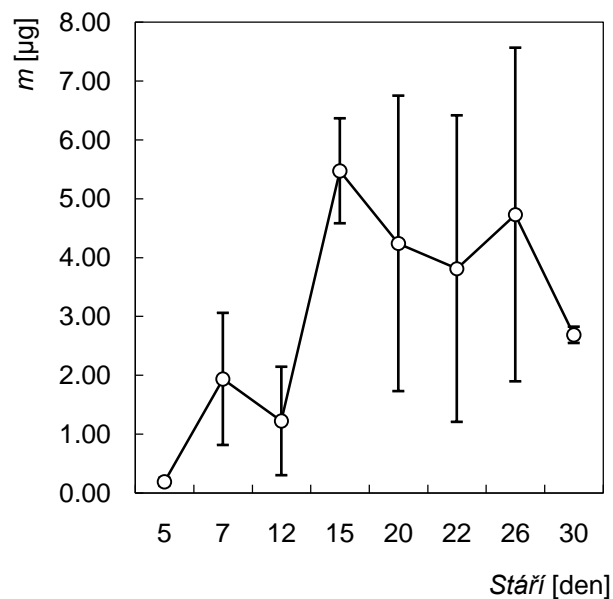
Obr. 4.3f Graf závislosti množství limonenu **6** na stáří much

(Z)- β -ocimen dosahuje maxima 12. den od vykuklení. Jeho trend odpovídá předpokladu, že po dosažení určitého věku much začne množství klesat. Přítomnost (Z)- β -ocimenu byla dříve potvrzena u *A. suspensa*, ale jeho behaviorální role není známa¹³.

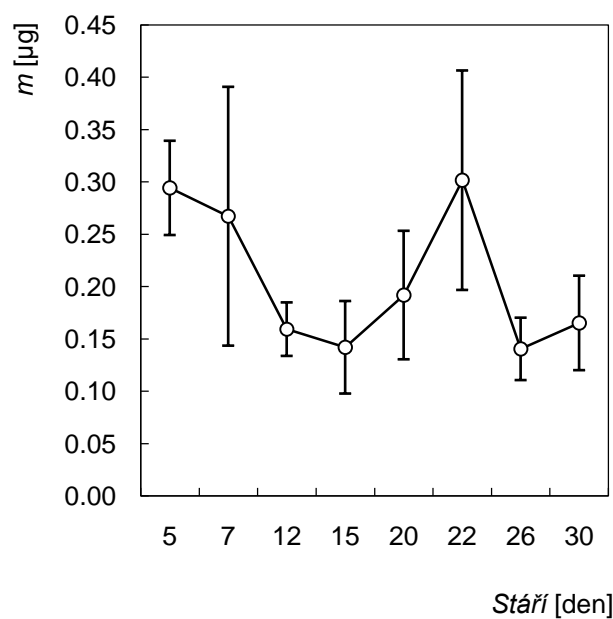


Obr. 4.3g Graf závislosti množství (Z)- β -ocimenu **7** na stáří much

Maximální množství (E)- β -ocimenu bylo emitováno mouchami starými 15 dní. Vzhledem k podobným odchylkám 20. - 26. den po vylíhnutí nelze hovořit o kolísavém trendu. (E)- β -ocimen a nonanal byly dříve identifikovány pouze u populace *A. fraterculus* z Argentiny a Peru³⁷.



Obr. 4.3h Graf závislosti množství (*E*)-β-ocimenu **8** na stáří much

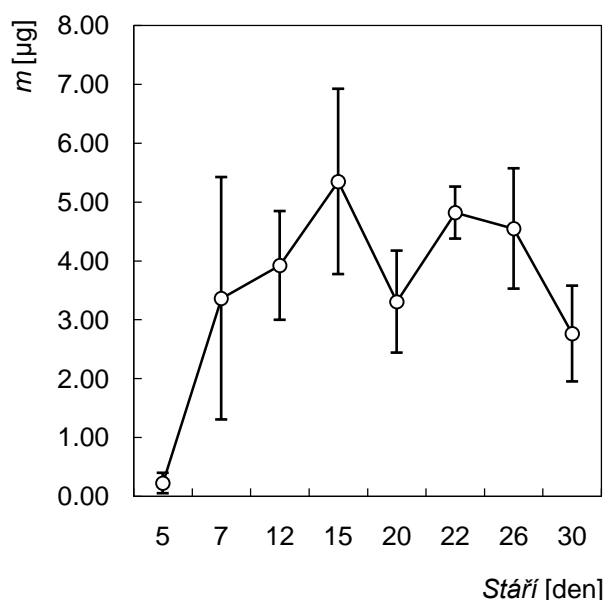


Obr. 4.3i Graf závislosti množství nonanalů **9** na stáří much

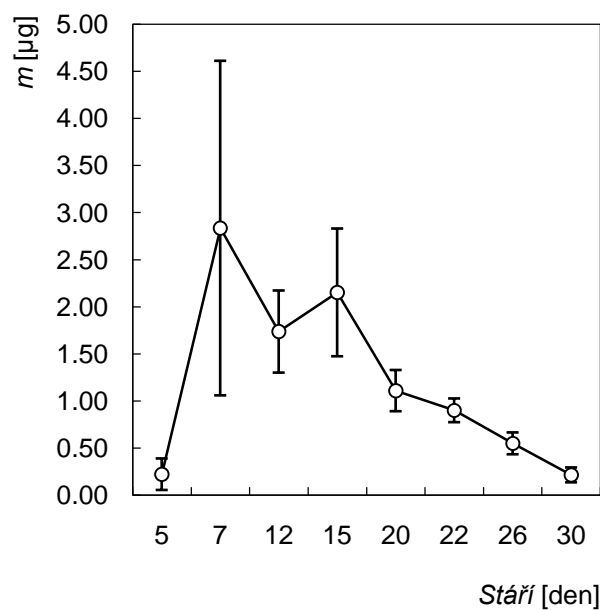
Nejdůležitější vylučované látky jsou látky vykazující antenální aktivitu, kterými jsou (3*Z*)-non-3-en-1-ol, (3*Z*,6*Z*)-nona-3,6-dien-1-ol, (*Z*,*E*) a (*E*,*E*) izomery α-farnesenu, *trans*-α-bergamoten a epianastrefin³⁷ (Obr. 4.3j, k, m, o, r, t). U (3*Z*)-non-3-en-1-olu a (3*Z*,6*Z*)-nona-3,6-dien-1-olu byla poprvé prokázána aktivita pomocí laboratorních biologických testů na samičkách *A. suspensa* starých 10 dní³⁸. U samiček *A. ludens*

vyvolávaly tyto alkoholy také behaviorální odpověď a to v kombinaci s epianastrefinem³⁹. Majoritní složky feromonu *A. ludens* a *A. suspensa* tvoří suspensolid a diastereomerické bicycklické laktony anastrefin a epianastrefin⁴⁰, zatímco majoritní složkou sexuálního feromonu *A. fraterculus* je (*E,E*)- α -farnesen.

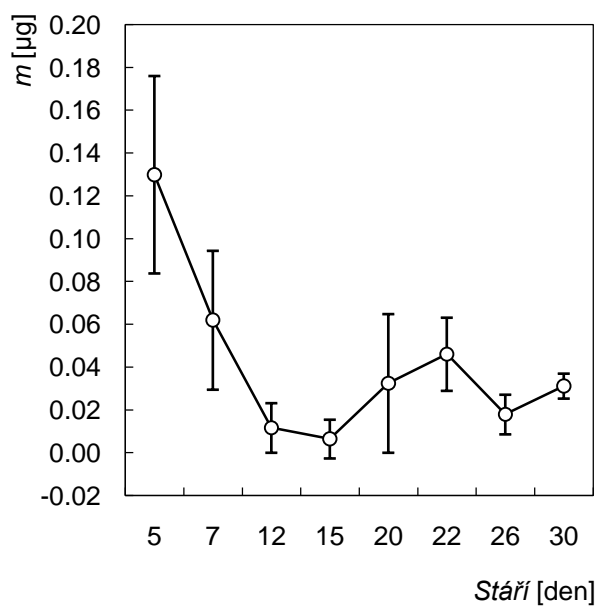
Trend identifikovaných antenálně aktivních látek poměrně dobře (s výjimkou (*E,E*)- α -farnesenu) odpovídá předpokladu, že nejmladší mouchy budou produkovat minimální množství látek, které se s přibývajícím věkem bude zvyšovat až dosáhne maxima. Maximální množství (3*Z*)-non-3-en-1-olu, (3*Z*,6*Z*)-nona-3,6-dien-1-olu a (*Z,E*)- α -farnesenu bylo emitováno mouchami starými 15 dní, (*E,E*)- α -farnesenu a epianastrefinu mouchami starými 20 dní a anastrefinu mouchami starými 22 dní.



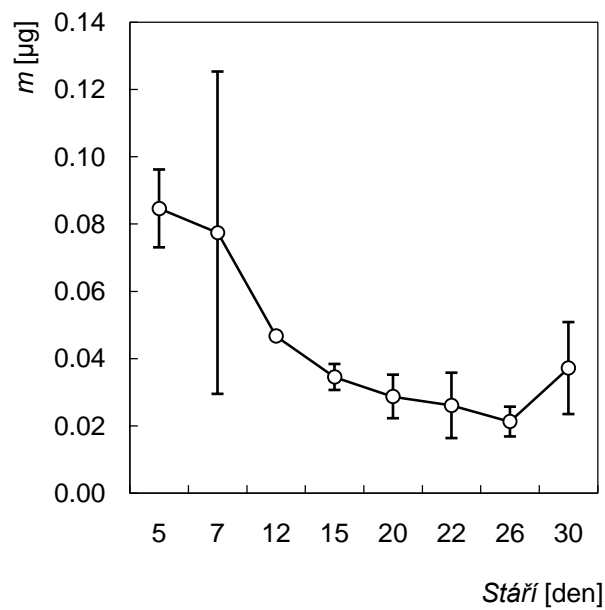
Obr. 4.3j Graf závislosti množství (3*Z*)-non-3-en-1-olu **10** na stáří much



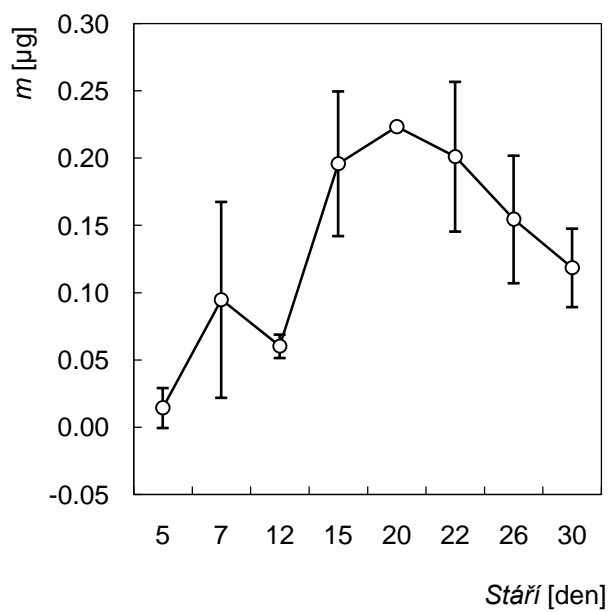
Obr. 4.3k Graf závislosti množství (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-olu **11** na stáří much



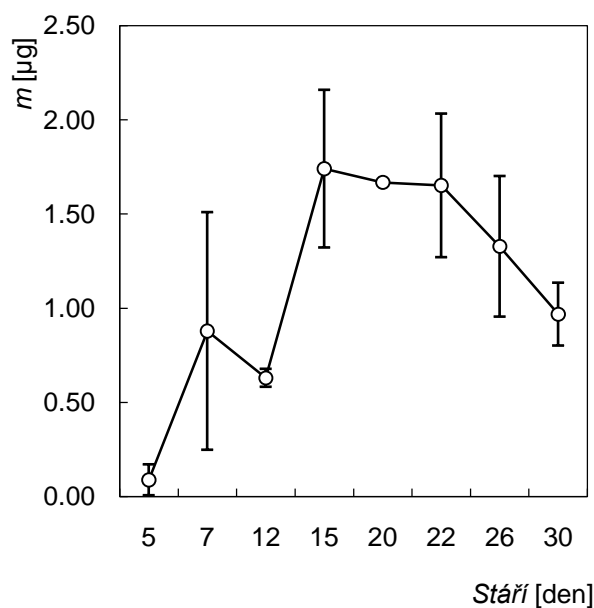
Obr. 4.3l Graf závislosti množství aromadendrenu **12** na stáří much



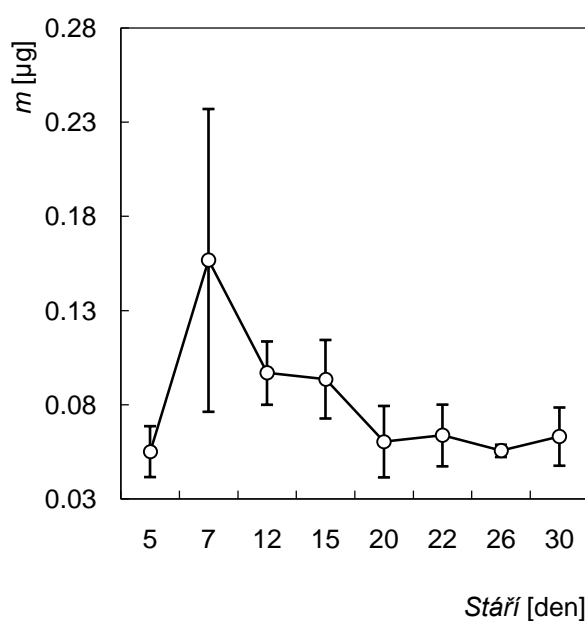
Obr. 4.3m Graf závislosti množství *trans*- α -bergamotenu **13** na stáří much



Obr. 4.3n Graf závislosti množství (*Z*)- β -farnesenu **14** na stáří much

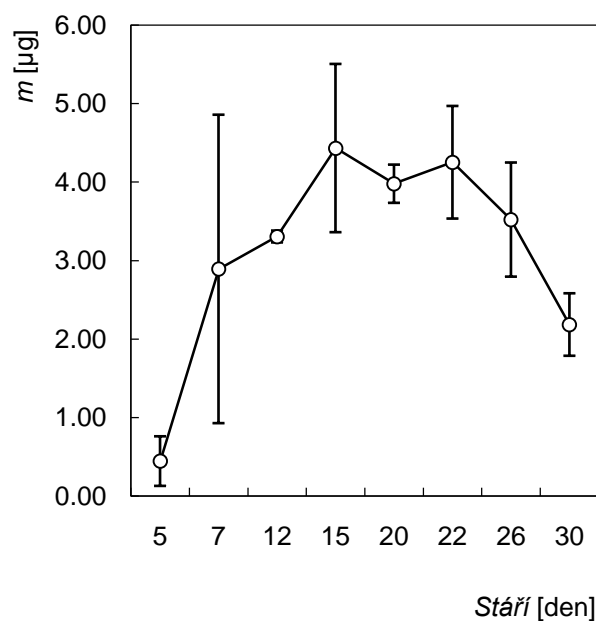


Obr. 4.3o Graf závislosti množství (Z,E) - α -farnesenu **15** na stáří much



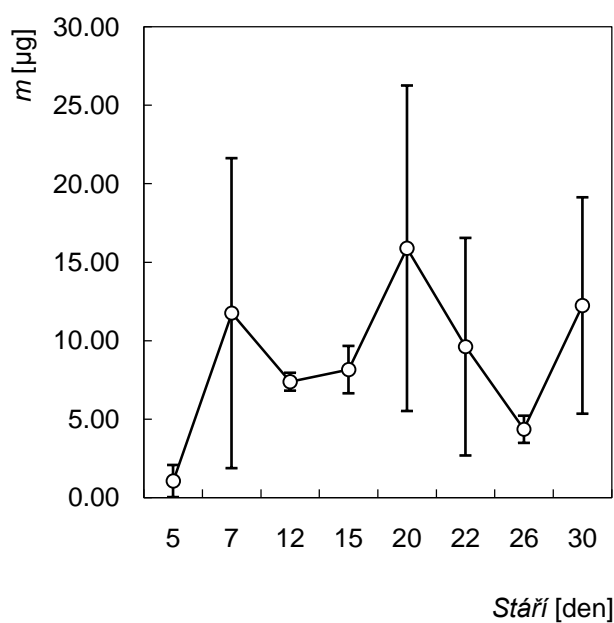
Obr. 4.3p Graf závislosti množství germakrenu D **16** na stáří much

Jednou z nejvíce zastoupených látek je suspensolid (Obr. 4.3q), ačkoli není antenálně aktivní³⁷. Tato látka je však velmi významná, jelikož je prekurzorem pro biosyntézu anastrefinu a epianastrefinu^{13,17,40,41}. Maximální množství suspensolidu (4,43 μg) bylo produkováno mouchami starými 15 dní, což je období počátku sexuální aktivity samců.



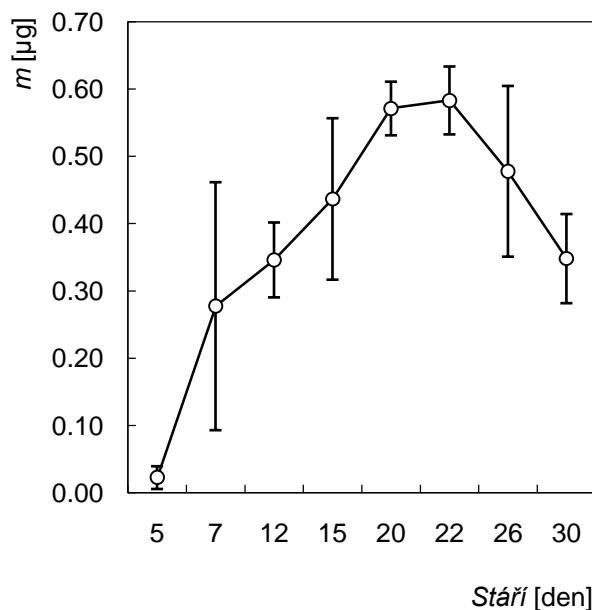
Obr. 4.3q Graf závislosti množství suspensolidu **17** na stáří much

Majoritní složkou sexuálního feromonu *A. fraterculus* je (*E,E*)- α -farnesen (Obr. 4.3r), jehož maximální množství bylo 15,87 μg a bylo produkováno mouchami starými 20 dní. Kolísání trendu neodpovídá žádné teorii, množství antenálně aktivních látek by mělo podle předpokladu po dosažení určitého věku klesat.

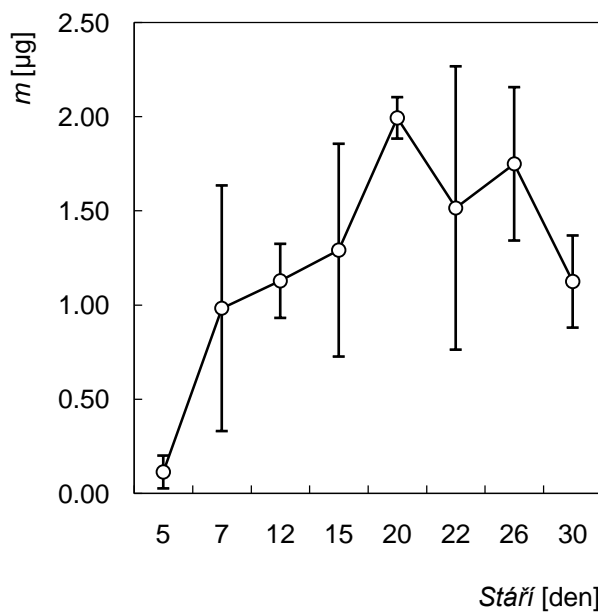


Obr. 4.3r Graf závislosti kvantitativního složení (*E,E*)- α -farnesenu **18** na stáří much

Množství anastrefinu je minimální 5. den, dále postupně vzrůstá a 22. den dosahuje maxima 0,58 μg a nastává pokles.



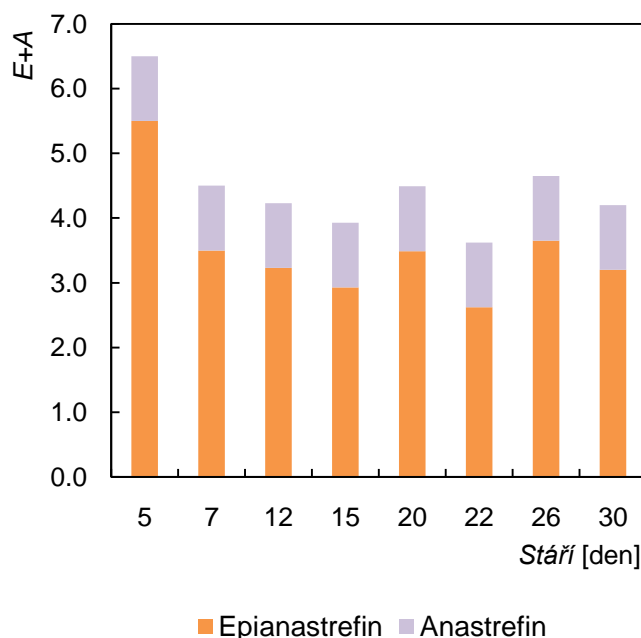
Obr. 4.3s Graf závislosti množství anastrefinu **19** na stáří much



Obr. 4.3t Graf závislosti množství epianastrefinu **20** na stáří much

Výsledkem předchozích studií laboratorní syntézy anastrefinu a epianastrefinu ze suspensolidu jako výchozí látky byl vznik směsi těchto dvou diastereoizomerů v poměru 1:2,3. Poměrové zastoupení látek v této směsi napodobuje přirozený poměr

epimerů u *A. ludens* a *A. suspensa*⁴¹. Mé výsledky ukazují, že u *A. fraterculus* je poměr těchto epimerů odlišný, což může být dáno tím, že se jedná o jiný druh. Vizualizace poměrů epianastrefinu a anastrefinu je znázorněna na obr. 4.4. Nejmladší mouchy neprodukují téměř žádný anastrefin vzhledem k epianastrefinu, tudíž byl poměr anastrefinu k epianastrefinu 1:5,5 a v dalších dnech kolísal v rozmezí 1:2,93 až 1:3,65.



Obr. 4.4 Vizualizace poměru epianastrefinu a anastrefinu v závislosti na stáří much

Předchozí studie zdokumentovaly, že existuje několik silných biotických a abiotických faktorů, které mohou ovlivňovat produkci a uvolňování těkavých sloučenin u rodu *Anastrepha*^{13,42,43}. Například množství a poměr uvolňovaných sloučenin se může lišit v závislosti na denní době v rámci jednoho druhu⁴⁴. Například u *A. obliqua* předběžné studie ukázaly, že denní a věk ovlivňují uvolňování těkavých sloučenin, ale bohužel další vlivy zatím nejsou známy^{44,45,46}. Toto vše potvrzují i naše měření. Biologický materiál není stejnorodý, a proto hodnota směrodatných odchylek může být tak variabilní. Pro potvrzení této teorie by při dostatku materiálu bylo potřeba udělat nejméně deset měření, což v mém případě nebylo možné.

5 ZÁVĚR

Samečci *A. fraterculus* emitují dvacet těkavých látek, z toho čtrnáct terpenů: α -pinen, kamfen, β -pinen, myrcen, karen, limonen, (Z)- β -ocimen, (E)- β -ocimen, aromadendren, *trans*- α -bergamoten, (Z)- β -farnesen, (Z,E)- α -farnesen, germakren D, (E,E)- α -farnesen; jeden aldehyd: nonanal; dva alkoholy: (3Z)-non-3-en-1-ol, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-ol a tři laktony: suspensolid, anastrefin a epianastrefin. Z výše uvedených látek byla u šesti z nich dříve prokázána antenální aktivita a to u *trans*- α -bergamotenu, (Z,E)- α -farnesenu, (E,E)- α -farnesenu, (3Z)-non-3-en-1-olu, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-olu a epianastrefinu. Nově identifikovanými látkami emitovanými druhem *A. fraterculus* jsou α -pinen, kamfen, β -pinen, myrcen, Δ^3 -karen, (E)- β -ocimen, nonanal, aromadendren, (Z)- β -farnesen a germakren D.

Předpoklad, že nejnižší množství látek budou produkovány mouchami starými 5 dní, byl potvrzen u (Z) a (E) izomerů β -ocimenu, (3Z)-non-3-en-1-olu, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-olu, (Z)- β -farnesenu, (Z,E)- α -farnesenu, germakrenu D, (E,E)- α -farnesenu, suspensolidu, anastrefinu a epianastrefinu.

Předpoklad, že množství těkavých látek bude po dosažení maxima s přibývajícím počtem dní od vylíhnutí klesat, byl potvrzen u myrcenu, (3Z,6Z)-nona-3,6-dien-1-olu, (Z)- β -farnesenu, (Z,E)- α -farnesenu a anastrefinu. Tento trend má v podstatě i (Z)- β -ocimen, kde výjimku představuje jen minimální zvýšení množství emitovaného 20. den oproti 15. dnu, od 22. dnu dochází opět k postupnému poklesu.

Soupis bibliografických citací

1. Weems Jr., H. V.: *South American fruit fly Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (*Insecta: Diptera: Tephritidae*). Dostupné z URL: <<http://edis.ifas.ufl.edu/in545>> [15.3. 2013]
2. De Lima, I. S.; Howse, P. E.; Salles, L. A. B.: Reproductive behaviour of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field studies. *Physiological Entomology* **19**, 271–277 (1994).
3. Hernández-Ortiz, V.; Bartolucci, A. F.; Morales-Valles, P.; Frías, D.; Selivon, D.: Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of south american morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America* **105**, 305–318 (2012).
4. Plantwise knowledge bank. Dostupné z URL: <<http://www.plantwise.org/knowledgebank/DatasheetImages.aspx?dsID=5648>> [15.3 2013]
5. Morgante, J. S.; Malawasi, A.; Prokopy, R. J.: Mating behavior of wild *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) on a caged host tree. *The Florida Entomologist* **66**, 234–241 (1983).
6. Silva, M. T.; Polloni Y. J.; Bressan, S.: Mating behavior of some fruit flies of the genus *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. *Revista Brasileira de Entomologia* **29**, 155–164 (1985).
7. Hoskovec, M.: Chemická komunikace hmyzu pohledem organického chemika. *Chemické Listy* **94**, 897–904 (2000).
8. Do Nascimento, R. R.; Morgan, E. D.: Chemicals involved in the communication system of social insects: their source and methods of isolation and identification, with special emphasis of ants. *Química Nova* **19**, 156–165 (1996).
9. Regnier, F. E.; Law, J. H.: Insect pheromones. *Journal of Lipid Research* **9**, 541–551 (1968).

10. Luxová, A.; Valterová, I.: Biosyntéza hmyzích feromonů. *Chemické Listy* **100**, 243–255 (2006).
11. Ayasse, M.; Paxton, R. J.; Tengö, J.: Mating behavior and chemical communication on the order Hymenoptera. *Annual review of Entomology* **46**, 31–78 (2001).
12. Nation, J. L.: Sex-specific glands in tephritid fruit flies of the genera *Anastrepha*, *Ceratitis*, *Dacus* and *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **10**, 121–129 (1981).
13. Nation, J. L.: Biology of pheromone release by male Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology* **16**, 553–572 (1990).
14. Lima, S. I.; House, P. E.; do Nascimento, R. R.: Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied. (Diptera: Tephritidae): identification and behavioral activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **12**, 196–201 (2001).
15. Robacker, D. C.; Garcia, J. A.: Responses of laboratory-strain Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, to combinations of fermenting fruit odor and male-produced pheromone in laboratory bioassays. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 2027–2038 (1990).
16. Rocca, J. R.; Nation, J. L.; Strekowski, L.; Battiste, M. A.: Comparison of volatiles emitted by male Caribbean and Mexican fruit flies. *Journal of Chemical Ecology* **18**, 223–244 (1992).
17. Chuman, T.; Sivinski, J.; Heath, R. R.; Calkins, C. O.; Tumlinson, J. H.; Battiste, M. A.; Wydra, R. L.; Strekowski, L.; Nation, J. L.: Suspensolide, a new macrolide component of male caribbean fruit-fly (*Anastrepha suspensa* [Loew]) volatiles. *Tetrahedron Letters* **29**, 6561–6564 (1988).
18. Purcell, M. F.: Contribution of biological control to integrated pest management of tephritid fruit flies in the tropics and subtropics. *Integrated Pest Management Reviews* **3**, 63–83 (1998).

19. Vas, G.; Vékey, K.: Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* **39**, 233–254 (2004).
20. *Techniques in pheromone research*. H. E. Hummel, T. A. Miller (Eds.). New York Springer 1984.
21. Ashman, T.; Bradburn, M.; Cole, D. H.; Blaney, B. H.; Raguso, R. A.: The scent of a male: the role of floral volatiles in pollination of a gender dimorphic plant. *Ecology* **86**, 2099–2105 (2005).
22. Flórez Menéndez, J. C.; Fernández Sánchez, M. L.; Fernández Martínez, E.; Sánchez Uría, J. E.; Sanz-Medel, A.: Static headspace versus head space solid-phase microextraction (HS-SPME) for the determination of volatile organochlorine compounds in landfill leachates by gas chromatography. *Talanta* **63**, 809–814 (2004).
23. Jones, G. R.; Oldham, N. J. : Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* **843**, 199–236 (1999).
24. Procházková, D.: Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy* **96**, 827–852 (2002).
25. Hoskovec, M.; Kalinová, B.; Knížek, M.: Chiral and Nonchiral GC×GC/TOFMS Analysis of Natural Compounds: The Case of Possible Aggregation Pheromones of Chinese Bark Beetles *Ips shangrila* and *Ips nitidus*. In: *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. B. Salih, Ö. Çelikbıçak (Eds.). Rijeka: InTech, 2012, p. 325–346.
26. Adahchour, M.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.: Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1186**, 67–108 (2008).
27. Poliak, M.; Kochman, M.; Amirav, A: Pulsed flow modulation comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1186**, 189–235 (2008).

28. Kalinová, B.; Jiroš, P.; Žďárek, J.; Wen, X.; Hoskovec, M.: GC×GC/TOF MS technique – A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. *Talanta* **69**, 542–547 (2006).
29. Nation, J. L.: The role of pheromones in the mating system of *Anastrepha* fruit flies. In: *Fruit Flies, Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol. 3A. A. S. Robinson, G. Hooper (Eds.). Amsterdam: Elsevier, 1989, p. 189–205.
30. Volatile Collection Trap. Dostupné z URL:
<http://www.arsfla.com/mainpages/volatile%20collection/vct/volatile_vct.html>
[20.4.2013]
31. Čabala, R.: *Plynová chromatografie*. Dostupné z URL:
<<http://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/plynova-chromatografie-pro-studenty-kata/kvalita-a-kvantita-v-gc>> [9.5.2013]
32. Adams, R. P.: Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. 4th ed. Carol Stream, Allured Publishing Corporation 2007.
33. Database of pheromones and semiochemicals. Dostupné z URL:
<www.pherobase.com> [8.5.2013]
34. Zachař, P.; Sýkora, D.: *Plynová chromatografie*. Dostupné z URL:
<<http://www.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>> [9.5.2013]
35. Poustka, J.: Chromatografie – metody kvantitativní analýzy. Dostupné z URL:
<<http://web.vscht.cz/poustkaj/Chromatografie%20kvantita.htm>> [9.5.2013]
36. Cáceres, C.; Segura, D. F.; Vera, M. T.; Wornoayporn, V.; Cladera, J. L.; Teal, P.; Sapountzis, P.; Bourtzis, K.; Zacharopoulou, A.; Robinson, A. S.: Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biological Journal of the Linnean Society* **97**, 152–165 (2009).
37. Břízová R.: Analýza samčího sexuálního feromonu *A. fraterculus*. Diplomová práce. Praha, 2011.

38. Battiste, M. A.; Strekowski, L.; Vanderbilt, D. P.; Visnick, M.; King, R. W.; Nation, J. L.: Anastrephin and epianastrephin, novel lactone components isolated from the sex pheromone blend of male Caribbean and Mexican fruit flies. *Tetrahedron Letters* **24**, 2611–2614 (1983).
39. Robacker, D. C.: Behavioral responses of female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, to components of male-produced sex feromone. *Journal of Chemical Ecology* **14**, 1715–1726 (1988).
40. Battiste, M. A.; Wydra, R. L.; Strekowski, L.: Efficient and stereoselective synthesis of 10-hydroxy-4,8-dimethyldeca-3(*E*),8(*E*)-dienoic acid, a precursor to (3*E*,8*E*)-suspensolide, anastrephin, and epianastrephin. *The Journal of Organic Chemistry* **61**, 6454–6455 (1996).
41. Battiste, M. A.; Strekowski, L.; Coxon, J. M.; Wydra, R. L.; Harden, D. B.: Highly stereoselective rearrangement of (*E,E*)-suspensolide to anastrephin and epianastrephin. *Tetrahedron Letters* **32**, 5303–5304 (1991).
42. Moreno, D. S.; Sanchez, M.; Robacker, D. S.; Worley, J.: Mating competitiveness of irradiated Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* **84**, 1227–1234 (1991).
43. Epsky, N. D.; Heath, R. R.: Food availability and feromone production by males of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* **22**, 924–947 (1993).
44. Heath, R. R.; Landolt, P. J.; Robacker, D. C.; Dueben, B. D.; Espky, N.: Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior. In: *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. M. Aluja, A. L. Norrbom (Eds.). CRC: Boca Raton, Florida, 2000, p. 793-809.
45. Meza-Hernández, J. S.; Hernández, E.; Salvador-Figueroa, M.; Cruz-López, L.: Sexual compatibility, mating performance and sex pheromone release of mass-reared and wild *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) under field-cage conditions. Proceedings of 6th International Fruit Fly Symposium, 6-10 May 2002, Stellenbosch, South Africa.

46. López-Guillén, G.; Cruz-López, L., Malo, E.A.; González-Hernández, H.; Cazeres, C.L.; López-Callado, J.; Toledo, J.; Rojas, J.C.: Factors influencing the release of volatile in *Anastrepha obliqua* male (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* **37**, 876-882 (2008).